



Universitat Jaume I
Departament de Química Física i Analítica
Àrea de Química Analítica

Institut Universitari de Plaguicides i Aigües

**EVALUACIÓN DE DIFERENTES ESTRATEGIAS BASADAS EN
ESPECTROMETRÍA DE MASAS PARA LA DETERMINACIÓN
DE ESPECIES DE As, Se Y Hg. ADAPTACIÓN AL CAMPO
DEL ANÁLISIS ORGÁNICO**

Tesis Doctoral
ÁNGEL CASTILLO TIRADO
2012

Dr. Antoni Francesc Roig i Navarro, Profesor Titular de Química Analítica de la Universitat Jaume I de Castellón,

Certifica: que la Tesis Doctoral “Evaluación de diferentes estrategias basadas en espectrometría de masas para la determinación de especies de As, Se y Hg. Adaptación al campo del análisis orgánico” ha sido desarrollada bajo su dirección, en el Instituto Universitario de Plaguicidas y Aguas, Departamento de Química Física y Analítica de la Universitat Jaume I de Castellón, por **Ángel Castillo Tirado**.

Lo que certifico para los efectos oportunos en Castellón de la Plana, a 25 de Junio de 2012.

Fdo. Dr. Antoni Francesc Roig i Navarro

De acuerdo con el artículo 13.2 RD 99/2011 y el artículo 18 de la Normativa de los Estudios de Doctorado de la Universitat Jaume I de Castellón (26-01-2012), la presente tesis ha sido evaluada por dos censores independientes directamente relacionados con el área de investigación, Dra. Riansares Muñoz Olivas (Profesora Titular del Departamento de Química Analítica de la Universidad Complutense de Madrid) y Dr. José Luís Todolí Torró (Catedrático del Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología de la Universidad de Alicante).

No voldria desaprofitar l'ocasió per a agrair el suport que he rebut de les nombroses persones que m'han acompanyat durant aquests anys d'aprenentatge, les quals no sols m'han aportat coses positives per a la tesi sinó també per a la vida. Gràcies a tots vosaltres per permetrem créixer com a ésser humà.

En primer lloc, li vull transmetre al meu director de tesi que em sent afortunat i orgullós de que m'haja dirigit. Sens dubte ha aconseguit contagiar-me el seu entusiasme per la investigació. Els motius? La seua atenció, dedicació, paciència, complicitat, amistat... Tot plegat ha fet que haja passat de ser un cap a un amic, i d'amic a pràcticament un pare. Gràcies Toni!

No puc tindre més que paraules d'agraïment per al Dr. Félix Hernández, que ha fet possible que formara part de l'Institut Universitari de Plaguicides i Aigües (IUPA). Pels seus valuosos consells, la seua inestimable ajuda i el seu tracte humà, gràcies.

Gràcies als meus companys del grup d'investigació:

Edu, Ramón (els meus companys de despatx, si és que amb ells dóna gust treballar), Maria (a qui admire com a investigadora i encara més com a persona), Tania (he de reconèixer que ha sigut tot un plaer ser víctima de les seues bromes, doncs m'han regalat somriures en els moments en que més ho necessitava), Jaime, Robert (companys de fatigues i sempre predisposats a escoltar-te), Jose (un altre bon amic que em permet fer-li bromes sobre el Castelló, encara que sap que en el fons també vull que guanye), Mercedes, Arantxa (amb qui sempre es fan curtes les estones de cafè), Inés, Cristina, Emma (les meus veïnes de despatx a qui aprecie molt), Laura, Sandra (amb qui he compartit l'equip, gràcies a les que he convertit en reptes els problemes que han anat sorgint), Cristian, Jose Miguel, Gabriel, Sergi, Mónica, Sonia, Merche (sempre de bon humor i disposats a ajudar-te), Vima (que té una de energia natural i una alegria que s'encomana), Clara, Laura, Neus, Montse, María B., Ana Maria (les últimes incorporacions al grup, plenes d'entusiasme i ganes d'aprendre), Susana, Miguel Ángel, Carlos, Elena, Óscar, Cecilia, Tati, Marian, Mireia, Cru (que han format part del grup en alguna etapa de la meua tesi) i molt especialment a Sonia Triguero, sempre et recordaré.

També volia agrair de manera molt especial a la resta de professors de l'àrea: Juanvi, Paco, Ximo, Roque i Elena per donar-me un cop de mà sempre que ho he necessitat.

Gracias al Dr. José Ignacio García Alonso, una de las personas más brillantes que he conocido, por darme la oportunidad de realizar una estancia de investigación en el Departamento de Química Física y Analítica de la Universidad de Oviedo, así como al resto del laboratorio, especialmente a Pablo Rodríguez y Giuseppe Centineo. Por culpa de todos ellos, Oviedo se ha convertido en mi segunda casa.

Per últim, encara que no en importància, no puc deixar de nomenar a la meua família. Als meus pares, gràcies per transmetre'm el valors, educació i atencions sense els quals no haguera escrit mai aquestes línies. A les meues germanes, cunyat i nebots, gràcies per compartir amb mi tants i tants moments. I a Maria José sols dir-li que gràcies per ser com és, no podria fer-me més feliç.

A tots vosaltres (espere no haver-me deixat a ningú) moltíssimes gràcies,

Àngel

RESUMEN

En la presente tesis se ha investigado el potencial de diferentes acoplamientos instrumentales para llevar a cabo estudios de especiación de As, Se y Hg en muestras medioambientales y biológicas a nivel de trazas y ultratrazas. Para ello, las especies seleccionadas son separadas mediante una técnica cromatográfica y detectadas posteriormente por espectrometría de masas. Para corregir los problemas asociados a la etapa de separación y a la matriz de la muestra se han propuesto diferentes estrategias basadas en la utilización de sistemas de bajo flujo y la cuantificación mediante la técnica de análisis por dilución isotópica. La metodología analítica desarrollada se ha validado de acuerdo con los criterios de calidad establecidos, proporcionando una excelente sensibilidad, selectividad, rapidez y robustez que garantiza la fiabilidad de los resultados obtenidos.

El trabajo presentado se estructura en tres grandes bloques. En el primero de ellos se aborda la especiación de As en diferentes matrices por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (LC-ICP-MS). Para muestras de agua medioambiental se han incluido dos especies de Se, dada su previsible presencia en estas muestras y el carácter multielemental del detector. El segundo bloque se centra en la especiación de Hg en muestras de agua y pescado. Por último, se describe un procedimiento que permite la determinación de compuestos orgánicos por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem con analizador de triple cuadrupolo (LC-ESI-MS/MS) sin hacer uso de curva de calibrado.

El primer bloque se inicia con la adaptación de métodos ya desarrollados para cromatografía líquida de intercambio aniónico convencional a sistemas de bajo caudal (microHPLC). A diferencia de cuando se utilizan flujos convencionales, en estas nuevas condiciones algunas de las especies estudiadas presentaron interacciones adicionales al mecanismo de separación principal que impidieron su cuantificación. Se comprobó que la distorsión observada en los picos cromatográficos tenía como origen las conexiones capilares de sílice fundida (PFS) con los que viene equipado el microHPLC para minimizar el volumen extracolumna. Cuando se bombea una fase móvil a pH mayor de 8.5 se desprenden pequeños fragmentos de sus paredes que

contienen grupos silanol, los cuales interaccionan tanto con la fase estacionaria como con los analitos que contienen grupos hidroxilo mediante un mecanismo tipo enlace de hidrógeno. De acuerdo con el mecanismo propuesto, la substitución de los capilares de PFS por PEEK así como la disminución del pH por debajo de 8.5 permitió eliminar las interacciones adicionales observadas. Además, el uso de una fase móvil mixta a pH 8.7 basada en nitrato y fosfato, con grupos hidroxilo que compiten con los de los analitos, enmascaró el efecto de los productos de degradación de la sílice y mejoró la forma de pico de algunos de los compuestos determinados.

En el siguiente trabajo se evalúa el potencial de las columnas microbore en la especiación de As y Se. El menor diámetro interno de este tipo de columnas permite reducir considerablemente el flujo de fase móvil requerido en la separación de las distintas especies. Sin embargo, son más susceptibles a los ensanchamientos de pico originados por el volumen extracolumna, siendo imprescindible realizar una minimización de las dimensiones de todas las conexiones del sistema. En ese sentido, el capilar conectado al micronebulizador resultó ser clave de cara a no comprometer la correcta resolución de los picos cromatográficos. Por otro lado, se estudió el efecto de la composición y pH de la fase móvil en la forma de pico. Los mejores resultados se obtuvieron utilizando un gradiente de nitrato y fosfato a pH 8.3. Se observó que la disminución del diámetro interno de la columna microbore utilizada no supone una mejora en la eficiencia de la separación. No obstante, el menor tamaño de partícula con el que viene empaquetada proporcionó una mejor resolución, lo cual permitió aumentar la velocidad lineal de la fase móvil y reducir el tiempo de análisis a menos de 5 minutos. El método se validó a dos niveles de concentración (0.2 y $2 \mu\text{g L}^{-1}$ para As, 1 y $10 \mu\text{g L}^{-1}$ para Se) obteniéndose recuperaciones entre 89-106% y límites de detección (LODs) inferiores a $0.05 \mu\text{g L}^{-1}$ para las especies de As y de $0.35 \mu\text{g L}^{-1}$ para las de Se. El uso de una ecuación de corrección resultó satisfactorio para restar la contribución de la interferencia poliatómica $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$ sobre el pico de MMA, aunque su LOD depende notablemente del contenido salino en las muestras. El procedimiento desarrollado se aplicó a diferentes aguas de pozos de riego y abastecimiento urbano, encontrándose numerosos positivos a concentraciones menores de $1 \mu\text{g L}^{-1}$.

Posteriormente, se modificaron las condiciones cromatográficas para hacer posible la especiación de arsénico inorgánico en drenajes de aguas ácidas de mina.

El primer bloque de la tesis finaliza con el desarrollo y validación de un método innovador, por su rapidez y selectividad, para la determinación de especies de arsénico en muestras de orina humana mediante HPLC-ICP-MS. El análisis de este tipo de muestras provoca severos efectos matriz y de deriva de la señal, requiriendo el uso de patrones internos, generalmente de otro elemento con características físico-químicas similares. Para corregir estos problemas durante todo el cromatograma se propuso la adición de Ge post-columna mediante un sistema microHPLC, una vez separadas las diferentes especies de As. Dado que en el ICP-MS la señal depende exclusivamente del heteroátomo monitorizado, siendo independiente del compuesto de partida, se diseñó un procedimiento de calibración de un solo punto aplicable a las especies de As seleccionadas. Basado en la técnica de análisis por dilución isotópica inespecífica, éste consistió en la adición de una cantidad conocida de As a la disolución de patrón interno de Ge y en el cálculo del cromatograma de flujo másico, lo que proporcionó la concentración corregida de As(III), As(V), DMA, MMA y AsB en una sola inyección de muestra. El método se validó satisfactoriamente para una muestra de orina humana fortificada a tres niveles de concentración (1, 5 y 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ As) y otra no fortificada que contenía diferentes concentraciones de las especies de As. Los resultados coincidieron con los obtenidos utilizando calibración interna y adiciones estándar, dando coeficientes de variación menores del 8%. La continua adición de As post-columna provocó un incremento en los LODs (alrededor de 0.7 $\mu\text{g L}^{-1}$ As en la orina diluida 1:5 inyectada). En todo caso, la metodología propuesta constituye una rápida alternativa para evaluar el riesgo de la población expuesta a los compuestos tóxicos de arsénico.

El segundo bloque se inicia con el estudio de las ventajas que ofrecen los sistemas de nebulización de bajo caudal en la especiación de Hg por microHPLC-ICP-MS para la inyección directa de muestras de agua sin derivatización previa. La elución de compuestos organomercúricos en cromatografía de fase inversa precisa la adición de un agente quelante y un modificador orgánico, cuya pirolisis y consiguiente formación de depósitos de carbón provoca una considerable depresión de la señal. El

uso de micronebulizadores permite reducir la carga de disolvente en el plasma sin comprometer la cantidad de analito introducida, mejorando la sensibilidad. En primer lugar, se seleccionó el modificador orgánico para conseguir la separación de las diferentes especies de Hg. Se observó que el metanol provocaba menor disminución de la señal que el acetonitrilo, por lo que la fase móvil se basó en un gradiente de metanol. Posteriormente, se evaluó el comportamiento de diferentes nebulizadores al introducir una disolución patrón de Hg con cantidades crecientes de metanol. Los mejores resultados se obtuvieron con el micronebulizador Micromist. Además, al aumentar el porcentaje orgánico se requirió un menor caudal de gas de nebulización, lo que se tradujo en una respuesta diferente entre los compuestos menos y más retenidos. Por este motivo, se optimizó este parámetro para 5% de metanol, como compromiso a las fases móviles utilizadas. A causa de la variación de sensibilidad durante el cromatograma, resultó crítico minimizar el contenido de Hg del agente quelante para que la subida del nivel de la línea base no comprometiera la determinación de ninguna de las especies. El método se validó para aguas superficiales y subterráneas a dos niveles de concentración (0.5 y $10\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$), obteniéndose excelentes recuperaciones (85-100%) y precisiones ($\text{RSD}<2\%$) y límites de detección entre 8 y 32 ng L^{-1} , según el compuesto. No obstante, las recuperaciones para agua residual y agua de mar fueron muy bajas, por lo que para este tipo de matrices sería necesario un tratamiento de muestra previo a la inyección para eliminar su contenido salino. El procedimiento se aplicó a aguas de pozos de riego y abastecimiento urbano localizadas en el acuífero de la Plana de Castellón, detectándose la presencia de mercurio inorgánico (Hg(II)) en la mayoría de las muestras, aunque siempre en niveles por debajo de $1.5\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$. El metilmercurio se detectó en cinco de las aguas analizadas en concentraciones menores que las de Hg(II) . Por otra parte, en dos de las aguas se encontró etilmercurio y fenilmercurio, presentando una de ellas una concentración cinco veces superior al Hg(II) , lo que acentúa la importancia de controlar este tipo de compuestos.

En el siguiente trabajo se ha aplicado por primera vez el análisis por dilución isotópica con trazadores múltiples a espectrometría de masas molecular. Para ello, se hace uso de la deconvolución de perfiles isotópicos, que permite calcular la

contribución del compuesto natural y del marcado en el espectro de masas de cada pico cromatográfico. Proporciona además la concentración original de cada especie, pues tiene en cuenta cualquier reacción de interconversión que puede tener lugar durante el tratamiento de muestra. Este procedimiento se utilizó para desarrollar un método para la determinación simultánea de Hg(II) y metilmercurio en tejidos de pescado de alta calidad metrológica basado en la instrumentación GC-El-MS, más extendida que GC-ICP-MS debido a su menor coste y sofisticación. Para ello, se empleó Hg(II) enriquecido en ^{199}Hg y metilmercurio enriquecido en ^{201}Hg como trazadores, cuyas concentraciones se certificaron por GC-ICP-MS mediante dilución isotópica inversa y se compararon con GC-El-MS. Se observó que la disolución de metilmercurio enriquecida en ^{201}Hg contenía una impureza de Hg(II), por lo que se modificaron las ecuaciones para tener en cuenta su contribución. Las muestras se sometieron a una digestión básica y extracción con microondas focalizado, seguida de derivatización con tetrapropilborato de sodio, purificación de la fase orgánica con florisil y preconcentración con corriente de nitrógeno. La validación se llevó a cabo mediante el análisis de dos materiales de referencia certificados (CRMs): BCR-464 (atún) y DOLT-4 (cazón), y en términos de factores de degradación por comparación con los resultados obtenidos para las mismas muestras por GC-ICP-MS. A pesar de que se observó una considerable desmetilación para algunas condiciones de extracción, que dependían de la matriz de la muestra, las concentraciones calculadas coincidieron siempre con los valores certificados. Los coeficientes de variación oscilaron entre 2 y 7%, según la cantidad de cada especie presente en el CRM, y los LODs fueron menores de 10 ng g^{-1} .

Finalmente, en el último trabajo presentado se ha adaptado la dilución isotópica con deconvolución de perfiles isotópicos a la determinación de contaminantes orgánicos mediante espectrometría de masas en tándem con analizador de triple cuadrupolo. Como prueba de concepto se escogió un patrón interno marcado con ^2H para la cuantificación del fármaco diclofenaco en muestras de agua residual, haciendo uso del acoplamiento LC-ESI-MS/MS en modo SRM. Para ello, se realizó un estudio de cómo el perfil de abundancias isotópicas del analito natural y deuterado se ve modificado durante la fragmentación y se propuso un

procedimiento de cálculo para tener en cuenta dicha variación. Por otro lado, se certificó la concentración del patrón interno marcado para hacer posible su uso como trazador y se descartó la existencia de posibles efectos isotópicos durante las etapas de tratamiento de muestra y medida instrumental. Además, se dedujo una estrategia para restar la contribución del compuesto marcado en la transición de confirmación provocada por el solapamiento espectral entre ambos, que impide la confirmación del analito a bajas concentraciones. El método se validó para agua superficial, agua residual y agua residual depurada, incluyendo una etapa de preconcentración con extracción por fase sólida. Las recuperaciones estuvieron comprendidas entre 90-110% para todas las matrices estudiadas, con RSDs menores de 5%. Sin embargo, las recuperaciones obtenidas en las aguas residuales cuando no se utilizó fragmentación no fueron satisfactorias debido a la presencia de interferentes isobáricos, poniendo de manifiesto la necesidad de aplicar la deconvolución de perfiles isotópicos al modo SRM. El procedimiento propuesto hizo uso de sólo tres transiciones para la cuantificación y confirmación del analito, permitiendo su aplicación a métodos multiresiduales.

ÍNDICE GENERAL

Objetivos y plan de trabajo.....	1
----------------------------------	---

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. Introducción.....	9
1.2. Técnicas de separación.....	12
1.3. Fuentes de ionización.....	15
1.4. Analizadores de masas.....	18
1.5. Acoplamientos instrumentales utilizados.....	22
1.5.1 LC-ICP-MS (Q).....	23
1.5.2 LC-ESI-MS/MS (QqQ).....	24
1.5.3 GC-ICP-MS (Q).....	26
1.5.4 GC-EI-MS (Q).....	28
1.6. Análisis por dilución isotópica.....	29
1.6.1. Dilución isotópica inespecífica.....	32
1.6.2. Dilución isotópica específica.....	35
1.7. Bibliografía.....	38

CAPÍTULO 2. ESPECIACIÓN DE As EN MUESTRAS DE AGUA MEDIOAMBIENTAL Y ORINA HUMANA

2.1. Introducción.....	41
2.2. Interacciones adicionales de los grupos –OH de las especies de As y Se con los capilares de sílice fundida en micro-cromatografía líquida de intercambio aniónico.....	51

2.2.1.	Bibliografía.....	53
2.2.2.	Artículo científico 1.....	55
	“Secondary interactions, an unexpected problem emerged between hydroxyl containing analytes and fused silica capillaries in anion-exchange micro-liquid chromatography”	
	J. Chromatogr. A, 1172 (2007) 179–185	
2.3.	Potencial de las columnas microbore acopladas a ICP-MS en especiación de As y Se.....	73
2.3.1	Bibliografía.....	76
2.3.2	Artículo científico 2.....	79
	“Capabilities of microbore columns coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry in speciation of arsenic and selenium”	
	J. Chromatogr. A, 1202 (2008) 132–137	
2.4.	Aplicación del método de especiación desarrollado al estudio de la presencia de As y Se en el acuífero de la Plana de Castellón.....	99
2.5.	Determinación de As inorgánico en muestras ácidas.....	105
2.5.1.	Bibliografía.....	109
2.6.	Especiación de As en orina humana basada en pseudo-dilución isotópica inespecífica mediante el uso de Ge como patrón interno.....	111
2.6.1.	Bibliografía.....	114
2.6.2.	Artículo científico 3.....	117
	“Rapid screening of arsenic species in urine from exposed human by inductively coupled plasma mass spectrometry with germanium as an internal standard”	
	J. Anal. At. Spectrom., 27 (2012) 354-358	

CAPÍTULO 3. ESPECIACIÓN DE Hg EN MUESTRAS DE AGUA MEDIOAMBIENTAL Y TEJIDOS DE PESCADO

3.1. Introducción.....	133
3.2. Determinación de Hg(II), MeHg, EtHg y PhHg por micro-cromatografía líquida de fase inversa.....	141
3.2.1. Bibliografía.....	148
3.2.2. Artículo científico 4.....	151
“Method optimization for the determination of four mercury species by micro-liquid chromatography–inductively coupled plasma mass spectrometry coupling in environmental water samples”	
Anal. Chim. Acta, 577 (2006) 18–25	
3.3. Aplicación del método de especiación desarrollado al estudio de la presencia de Hg en el acuífero de la Plana de Castellón.....	171
3.4. Determinación de Hg(II) y MeHg en tejidos de pescado mediante espectrometría de masas molecular y dilución isotópica específica.....	174
3.4.1. Bibliografía.....	180
3.4.2. Artículo científico 5.....	183
“Multiple spiking species-specific isotope dilution analysis by molecular mass spectrometry: simultaneous determination of inorganic mercury and methylmercury in fish tissues”	
Anal. Chem., 82 (2010) 2773–2783	

CAPÍTULO 4. APLICACIÓN DE LA DECONVOLUCIÓN DE PERFILES ISOTÓPICOS A LA ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TÁNDEM DE BAJA RESOLUCIÓN

4.1. Introducción.....	211
4.2. Determinación y confirmación de diclofenaco en aguas sin curva de calibrado mediante IPD y LC-MS/MS con analizador QqQ.....	219
4.2.1. Bibliografía.....	225
4.2.2. Artículo científico 6.....	227
“Isotope pattern deconvolution-tandem mass spectrometry for calibration-free quantification in organic analysis. Application to the determination and confirmation of diclofenac in wastewaters”	
Anal. Chim. Acta (submitted)	

CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES..... 253

Índice de acrónimos

AAS	Espectrofotometría de absorción atómica
AES	Espectrofotometría de emisión atómica
AFS	Espectrofotometría de fluorescencia atómica
AMD	Drenaje de aguas ácidas de mina
API	Interfase a presión atmosférica
AsB	Arsenobetaína
AsC	Arsenocolina
CE	Electroforesis capilar
CRM	Material de referencia certificado
CSIC	Consejo superior de investigaciones científicas
DC	Potencial de corriente continua
DMA	Ácido dimetilarlésico
EI	Ionización electrónica
EPA	Agencia estatal para la protección del medioambiente de los Estados Unidos
ESI	Ionización por electrospray
ESI-MS	Espectrometría de masas con ionización por electrospray
ETAAS	Espectrofotometría de absorción atómica electrotérmica
EtHg	Etilmercurio
FAAS	Espectrofotometría de absorción atómica de llama
GC	Cromatografía de gases
GC-EI-MS	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas con ionización electrónica
GC-ICP-MS	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo
GC-IDMS	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas con dilución isotópica
GC-MS	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
GLC	Cromatografía gas-líquido
GSC	Cromatografía gas-sólido

HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HPLC-ICP-MS	Cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo
ICP	Plasma de acoplamiento inductivo
ICP-AES	Espectrofotometría de emisión atómica con plasma de acoplamiento inductivo
ICP-MS	Espectrometría de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo
IDA	Análisis por dilución isotópica
IDMS	Espectrometría de masas con dilución isotópica
IPD	Deconvolución de perfiles isotópicos
LC	Cromatografía líquida
LC-ESI-MS/MS	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem con ionización por electrospray
LC-ICP-MS	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo
LC-ID-MS/MS	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem con dilución isotópica
LC-MS	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas
LC-MS/MS	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem
LLE	Extracción líquido-líquido
LOD	Límite de detección
MeHg	Metilmercurio
microHPLC	Cromatografía líquida de bajo flujo
microHPLC-ICP-MS	Cromatografía líquida de bajo flujo acoplada a espectrometría de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo
MMA	Ácido monometilarsónico
MS	Espectrometría de masas
MS/MS	Espectrometría de masas en tándem
m/z	Relación masa/carga

PEEK	Polieteretercetona
PFA	Perfluoro-alcoxialcano
PFS	Sílice fundida cubierta de PEEK
PhHg	Fenilmercurio
ppb	Partes por billón
PTV	Temperatura de vaporización programada
Q	Analizador de iones cuadrupolar o cuadrupolo
Q1	Primer cuadrupolo
Q2	Celda de colisión
Q3	Segundo cuadrupolo
QqQ	Analizador de triple cuadrupolo
RF	Radiofrecuencia
RSD	Desviación estándar relativa
SIL-IS	Patrón interno marcado con un isótopo estable
SIM	Monitorización del ion seleccionado
S/N	Relación señal/ruido
SPE	Extracción en fase sólida
SRM	Monitorización de la transición seleccionada
TMAO	Óxido de trimetilarsina
UHPLC	Cromatografía líquida de ultra alta presión

Objetivos y plan de trabajo

La especiación como disciplina dentro de la química analítica queda recogida en la definición que de ella hace la *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC): "**speciation analysis** is the analytical activity of identifying and/or measuring the quantities of one or more individual chemical species in a sample". El concepto de especiación química, en cuanto que implica la identificación y cuantificación de compuestos químicos, es el que subyace en todo el trabajo que abarca la presente tesis doctoral. Cinco de los artículos científicos incluidos en la memoria (capítulos 2 y 3) están directamente relacionados con la problemática de la especiación de arsénico y mercurio mediante diferentes acoplamientos instrumentales y en muestras de creciente complejidad. El sexto trabajo (capítulo 4) supone la implementación de una de las metodologías empleadas en la especiación de mercurio –la espectrometría de masas con dilución isotópica mediante cálculos de deconvolución de perfiles isotópicos– a la determinación de compuestos orgánicos mediante la técnica LC-MS/MS

Aunque se considera ya una técnica madura, el análisis de especiación continua siendo un área de investigación atractiva que se enfrenta con éxito a gran número de retos, en parte por la creatividad de los investigadores, en parte por los avances instrumentales, especialmente en el campo de la espectrometría de masas y de las técnicas acopladas. Las diferentes propiedades de cada compuesto en que se presenta un elemento explican la necesidad del análisis de especiación. Uno de los mayores problemas con el que puede encontrarse el químico analítico es, precisamente, la interconversión de especies durante todo el proceso analítico. La preservación de la identidad o la cuantificación de los procesos de interconversión son dos estrategias que deben permitir obtener la concentración correcta.

La espectrometría de masas con dilución isotópica (IDMS) ha sido ampliamente utilizada para la determinación de elementos y es considerada de elevada calidad metrológica. La posibilidad de usar elementos enriquecidos en diferentes isótopos la hace particularmente útil en el campo de la especiación, pues permite cuantificar los procesos de interconversión que puedan ocurrir y el valor corregido de la concentración de cada especie en la muestra. Tradicionalmente IDMS se lleva a cabo midiendo la relación isotópica de dos isótopos de la muestra, artificialmente alterada por la adición de un patrón enriquecido en un isótopo diferente al de mayor abundancia natural. Sin embargo, los espectrómetros de masas permiten medir con gran exactitud las abundancias de todos los isótopos de un elemento. La medida de estas abundancias alteradas en la muestra y su comparación con las abundancias naturales y las de elemento marcado isotópicamente hace posible determinar con gran exactitud la fracción molar (y el número de moles) del compuesto en la muestra. El procedimiento de cálculo se denomina Deconvolución de Perfiles Isotópicos (IPD) y se puede llevar a cabo mediante resolución de matrices. Éste cálculo, aparentemente complicado, es fácilmente automatizable mediante cualquier hoja de cálculo. Los métodos basados en dilución isotópica evitan el uso de curva de calibrado, de manera que por cada medida sobre una muestra fortificada se dispone de un resultado.

Esta metodología se puede implementar a la determinación de compuestos orgánicos. Para ello, deben conocerse las abundancias de los diferentes isotopómeros de masa de cada compuesto y compararlos adecuadamente con los espectros experimentales (tras la alteración comentada, ahora con el compuesto orgánico marcado isotópicamente) que se pueden obtener tanto mediante espectrometría de masas convencional como con espectrometría de masas en tándem.

OBJETIVOS

Esta tesis ha perseguido la consecución de dos objetivos principales. El primero, y de mayor extensión, ha sido el desarrollo y validación de metodología analítica para llevar a cabo estudios de especiación en muestras medioambientales y biológicas a nivel de trazas y ultratrazas. Para ello, se ha hecho uso de diferentes acoplamientos instrumentales, según la naturaleza de los compuestos determinados, aplicando la técnica de análisis por dilución isotópica en las muestras de matriz más compleja. El segundo objetivo principal ha consistido en la implementación de parte de la metodología desarrollada para la especiación elemental al campo del análisis de compuestos orgánicos.

Se ha explorado el potencial de sistemas de bajo caudal para atenuar los problemas derivados del uso de disolventes orgánicos en cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (LC-ICP-MS). Además, se han estudiado las ventajas que supone el uso de columnas microbore, de 0.5-2.1 mm de diámetro interno, requeridas en la separación de los analitos en la escala de microflujos. Los métodos desarrollados, una vez validados, se han aplicado a muestras de agua del acuífero de la Plana de Castellón, permitiendo obtener por primera vez información sobre los niveles de especies de As, Se y Hg en estas aguas. Posteriormente, se han modificado las condiciones de separación para llevar a cabo la determinación de As(III) y As(V) en drenajes ácidos de mina. Para solventar los problemas asociados a la especiación de As en orina humana, se ha evaluado el uso de Ge como patrón interno y cuantificación mediante pseudo-dilución isotópica post-columna. Por otro lado, se ha diseñado un procedimiento para espectrometría de masas molecular basado en el análisis por dilución isotópica con trazadores múltiples y la deconvolución de perfiles isotópicos que permite corregir las reacciones de interconversión de Hg(II) y MeHg que pueden tener lugar durante el tratamiento de muestras de tejido de pescado. Finalmente, se ha aplicado la deconvolución de perfiles isotópicos a la determinación de contaminantes orgánicos mediante espectrometría de masas en tándem de baja resolución utilizando patrones internos marcados con un isótopo estable, con el fin de evitar el calibrado metodológico.

Para alcanzar los objetivos generales comentados, se han establecido una serie de objetivos específicos, que se presentan agrupados en función del elemento o compuesto químico a determinar.

- Determinación de especies de As y Se:
 1. Caracterización del acoplamiento microHPLC-ICP-MS para la especiación de As y Se por intercambio aniónico. Estudio de interacciones adicionales durante la separación cromatográfica.
 2. Evaluación de la eficiencia proporcionada por las microcolumnas utilizadas. Efecto del volumen extracolumna procedente de las conexiones capilares y del sistema de nebulización.
 3. Desarrollo y optimización de metodología para la especiación de As en orina humana basado en la técnica de pseudo-dilución isotópica.
 4. Comparación del método de pseudo-dilución isotópica con adiciones estándar o calibración interna en la corrección del efecto matriz.
- Determinación de especies de Hg:
 5. Estudio del efecto del disolvente orgánico, requerido en la elución de compuestos organomercúricos, sobre la sensibilidad del ICP-MS.
 6. Comparación de los acoplamientos microHPLC-ICP-MS y HPLC-ICP-MS.
 7. Estudio de la aplicabilidad de la técnica de dilución isotópica con trazadores múltiples a la determinación de especies químicas mediante espectrometría de masas molecular.
 8. Desarrollo y optimización de metodología para la determinación de especies de Hg en tejidos de pescado basada en la técnica GC-IDMS y deconvolución de perfiles isotópicos.
- Determinación de compuestos orgánicos mediante LC-ID-MS/MS e IPD:
 9. Estudio de la aplicabilidad del procedimiento de deconvolución de perfiles isotópicos a la espectrometría de masas en tándem con analizador de triple cuadrupolo.

10. Desarrollo de un método para la determinación de diclofenaco mediante LC-MS/MS (QqQ) e IPD.

PLAN DE TRABAJO

Para llevar a cabo la consecución de los objetivos marcados se ha seguido el siguiente plan de trabajo.

- Determinación de especies de As y Se:
 1. Selección de las especies de arsénico, selenio y mercurio a estudiar en función de su toxicidad y su previsible presencia en aguas medioambientales.
 2. Revisión bibliográfica sobre los métodos de análisis existentes para estos compuestos y específicamente en lo relativo al uso del acoplamiento HPLC-ICP-MS.
 3. Adaptación de los procedimientos de especiación convencionales a sistemas de bajo flujo: establecimiento de las condiciones óptimas para la utilización de columnas microbore y micronebulizadores.
 4. Desarrollo y validación de un método de especiación multielemental para arsénico y selenio por intercambio aniónico y otro de fase inversa para mercurio mediante microHPLC-ICP-MS.
 5. Aplicación del método validado a muestras de agua superficial y subterránea, recogidas en puntos localizados en el acuífero de la Plana de Castellón.
 6. Evaluación de diferentes fases móviles para llevar a cabo la determinación de arsénico inorgánico en muestras procedentes de la descarga ácida de la mina abandonada de Tinto-Santa Rosa (Huelva).
 7. Estudio del efecto matriz y deriva de la señal en el análisis de orina humana. Selección de un patrón interno para la especiación de arsénico que será adicionado post-columna con el fin de corregir estos problemas durante todo el cromatograma. Adaptación de la ecuación de la dilución isotópica inespecífica al procedimiento desarrollado, validación del método y aplicación a muestras reales y fortificadas.
- Determinación de especies de Hg:

8. Estudio de la pureza espectral de los iones fragmento generados en la interfase de ionización electrónica para calcular correctamente los perfiles isotópicos de las diferentes especies de Hg.
9. Certificación del contenido en MeHg e impureza de Hg(II) de la disolución de MeHg enriquecida mediante dilución isotópica inversa.
10. Deducción de las ecuaciones necesarias para el uso de dilución isotópica específica con dos trazadores que tienen en cuenta la presencia de impurezas en las disoluciones de marcado.
11. Optimización de la extracción de Hg(II) y MeHg en muestras de tejido de pescado mediante microondas focalizado y selección del agente derivatizante. Aplicación de la deconvolución de perfiles isotópicos a GC-El-MS y GC-ICP-MS y comparación de los resultados obtenidos. Validación del procedimiento propuesto mediante el análisis de dos materiales de referencia.
 - Determinación de compuestos orgánicos mediante LC-ID-MS/MS e IPD:
12. Selección de un compuesto orgánico que presente solapamiento espectral con su análogo marcado. Aplicación de la deconvolución de perfiles isotópicos para el cálculo de cada contribución en el espectro de masas. Deducción de las ecuaciones para la determinación sin curva de calibrado de diclofenaco mediante LC-ESI-MS/MS en modo SRM. Validación de la metodología para aguas residuales.

CAPÍTULO 1

Introducción general

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1.	Introducción.....	9
1.2.	Técnicas de separación.....	12
1.3.	Fuentes de ionización.....	15
1.4.	Analizadores de masas.....	18
1.5.	Acoplamientos instrumentales utilizados.....	22
1.5.1	LC-ICP-MS (Q).....	23
1.5.2	LC-ESI-MS/MS (QqQ).....	24
1.5.3	GC-ICP-MS (Q).....	26
1.5.4	GC-EI-MS (Q).....	28
1.6.	Análisis por dilución isotópica.....	29
1.6.1.	Dilución isotópica inespecífica.....	32
1.6.2.	Dilución isotópica específica.....	35
1.7.	Bibliografía.....	38

1.1. INTRODUCCIÓN

Desde la Revolución Industrial numerosos compuestos metálicos y semi-metálicos han sido extraídos, procesados químicamente y utilizados en diferentes aplicaciones. Esto ha conducido a una redistribución regional y global y para algunos elementos, más o menos peligrosos, a un incremento significativo de su concentración en la parte superior de la corteza terrestre y en la atmósfera. De esta forma, los niveles de una gran variedad de elementos en suelos, ríos, lagos, plantas, animales,... han aumentado considerablemente durante ese tiempo. Los estudios detallados sobre la distribución y contenidos de estos elementos en diversos departamentos ambientales y en los seres humanos han llegado a ser una de las principales tareas en investigación medioambiental y hay un continuo desafío para desarrollar nuevas metodologías y optimizar las ya disponibles. En este campo se ha observado un extraordinario progreso durante las dos últimas décadas, conduciendo a una nueva y mejorada información acerca del estado del medio ambiente.

Algunos metales y metaloides se encuentran en un extenso rango de concentraciones. Los niveles naturales comprenden desde ultratrazas (ng kg^{-1} o ng L^{-1}) hasta los mg kg^{-1} . Estos valores pueden verse incrementados debido a la contaminación antropogénica. Para realizar estudios sobre la toxicología de los metales, en trabajos médicos, ecotoxicológicos y en control alimentario son muy importantes la exactitud y precisión de los métodos de análisis de trazas. Por este motivo, se suele hacer uso de un detector específico del elemento, que proporciona información sobre el contenido total de éste en cada muestra analizada. Sin embargo, la diferente toxicidad y biodisponibilidad de las formas químicas o especies en las que se distribuyen estos elementos conlleva que, para evaluar los efectos nocivos que

pueden originar en el medio ambiente y la salud humana, no sólo sea necesaria su cuantificación sino también la identificación del compuesto del que forma parte. Así, en los últimos años, la determinación de especies o especiación se ha convertido en una relevante línea de investigación en Química Analítica. Las especies pueden ser diferentes estados de oxidación, compuestos organometálicos (incluyendo derivados orgánicos de elementos semi-metálicos) o formas complejas. Los métodos de especiación más comunes consisten en el acoplamiento de una técnica de separación cromatográfica con un detector específico del elemento.¹ En concreto, el uso de la espectrometría de masas atómica se ha ido generalizando en los últimos años debido a la aparición y desarrollo de la instrumentación con la que más habitualmente se lleva a cabo (y con la que suele identificarse): la espectrometría de masas con fuente de acoplamiento inductivo (ICP-MS). Esto es debido a la elevada sensibilidad, selectividad, capacidad multielemental y posibilidad de medir relaciones isotópicas que ofrece esta técnica. Además, es fácil de acoplar a la cromatografía líquida, que no requiere etapas previas de derivatización o cambios de disolventes, por lo que la combinación de ambas técnicas hace posible la inyección directa de muestras o extractos acuosos, simplificando de esta forma su análisis. Pese a estas ventajas, este acoplamiento no está exento de limitaciones. Las sales o disolventes orgánicos necesarios para conseguir la separación de las especies, así como algunos de los componentes presentes en las muestras, pueden provocar efectos matriz severos y una progresiva degradación de la señal. Por otro lado, el análisis de muestras sólidas incluye una etapa de extracción que puede originar la interconversión de las especies, dando lugar a cuantificaciones erróneas.

En la presente tesis se proponen diversas estrategias para solventar o reducir en la medida de lo posible los problemas asociados a la especiación de As, Se y Hg en muestras de distinta naturaleza. Para ello, se ha evaluado el potencial de sistemas de bajo flujo, la adición de patrón interno post-columna y la cuantificación mediante dilución isotópica con dos trazadores, según el caso de estudio. Además, se ha explorado el uso del acoplamiento GC-El-MS, no específico del elemento, como alternativa a GC-ICP-MS, más caro en cuanto a su adquisición y mantenimiento, para facilitar la implantación de métodos de especiación de trazas de metales basados en

dilución isotópica en laboratorios de ensayo. Para este fin, se ha utilizado la deconvolución de perfiles isotópicos, que permite calcular la contribución del analito natural y marcado tanto en el espectro de masas elemental como molecular sin hacer uso de curvas de calibrado. Puesto que este procedimiento de cálculo es extensible a compuestos marcados con ^{13}C o ^2H , tradicionalmente empleados como patrones internos, la parte final de la presente memoria recoge el trabajo llevado a cabo utilizando la dilución isotópica con deconvolución de perfiles isotópicos a la determinación de contaminantes orgánicos mediante espectrometría de masas en tándem de baja resolución.

A continuación, se exponen brevemente las principales características de las técnicas de separación, fuentes de ionización y analizadores de masas utilizados, y se explica el fundamento del análisis por dilución isotópica en su modalidad específica e inespecífica.

1.2. TÉCNICAS DE SEPARACIÓN

A pesar de la elevada selectividad que proporciona la detección por espectrometría de masas, resulta necesario realizar una separación previa de los diferentes componentes de la muestra con el fin de aislar en lo posible los analitos para facilitar su identificación y cuantificación, evitando de esta manera interferencias isobáricas o efectos matriz severos. Una de esas técnicas de separación es la cromatografía, que se basa en la diferente distribución de los componentes de la muestra entre una fase estacionaria y una fase móvil debido a diferencias de velocidad de desplazamiento de los compuestos al ser arrastrados por la fase móvil a través de la fase estacionaria. En función de la naturaleza de estas dos fases se pueden distinguir diferentes modalidades cromatográficas. A continuación se explica brevemente el fundamento de las técnicas de separación utilizadas a lo largo de la presente tesis doctoral:

La cromatografía líquida (LC) es la técnica más adecuada para separar compuestos polares y semi-polares poco volátiles o térmicamente lábiles. Consiste en una fase móvil líquida, normalmente una mezcla de disolventes o sales con distinta fuerza eluotrópica, que fluye a través de una columna empaquetada con una fase estacionaria que contiene un grupo activo. El proceso cromatográfico consiste en una repetición de etapas de adsorción/desorción mediante dicho grupo activo, que tienen lugar durante el movimiento de los analitos a través de la columna en función de sus afinidades. Para aumentar la eficiencia de las separaciones se ha reducido el tamaño de partícula de la fase estacionaria a unas pocas micras. Esto ha obligado a desarrollar sistemas capaces de soportar las altas presiones requeridas para conseguir el paso de la fase móvil a través de la columna analítica, dando lugar a la cromatografía de alta resolución (HPLC). La reciente aparición de la cromatografía líquida de ultra alta presión (UHPLC), basada en columnas de menos de 2 μm de tamaño de partícula, ha supuesto otro avance significativo en LC. En efecto, el uso de estos sistemas permite reducir extraordinariamente los tiempos de análisis sin comprometer la resolución cromatográfica. Otro factor a tener en cuenta es el diámetro interno de la columna, el cual determina el volumen de muestra que se puede inyectar y la cantidad de fase móvil necesaria para la separación. Por otro

lado, en función del soporte cromatográfico utilizado y el tipo de interacción que tiene lugar con el analito se pueden distinguir diferentes mecanismos de separación, lo que confiere a esta técnica una elevada versatilidad.^{2,3}

La cromatografía de gases (GC) constituye la técnica de separación más adecuada para la determinación de compuestos orgánicos no polares, volátiles o semi-volátiles y térmicamente estables. En este caso, la fase móvil consiste en un gas portador inerte de gran pureza, normalmente helio, que al aumentar la temperatura transporta los solutos desde el sistema de inyección hasta el detector. Aunque inicialmente se utilizaban columnas empaquetadas, en la actualidad han sido substituidas por las tubulares abiertas o capilares, de 0.1-0.32 mm de diámetro, que proporcionan mayor rapidez y eficiencia de separación. Estas columnas están compuestas por un tubo de sílice fundida con un recubrimiento exterior de poliimida, que le confiere resistencia mecánica y química, y otro interior con la fase estacionaria. En función del estado de agregación en que se encuentra la fase estacionaria se pueden distinguir dos modalidades cromatográficas: la cromatografía gas-sólido (GSC) y la cromatografía gas-líquido (GLC). En GSC la separación de los compuestos se basa en su distinta volatilidad y capacidad de ser adsorbidos por el sólido activo, teniendo su principal aplicación en gases permanentes e hidrocarburos C₁-C₆. Por su parte, la separación en GLC se fundamenta en las diferencias de volatilidad y solubilidad en la fase estacionaria líquida, que al ofrecer un amplio abanico de polaridades, permite resolver gran cantidad de compuestos. Para evitar el desprendimiento de fase estacionaria durante el proceso cromatográfico, lo que se conoce como sangrado, se suelen emplear fases estacionarias enlazadas y entrecruzadas. Esto hace posible su acoplamiento con detectores de alta sensibilidad, como la espectrometría de masas. Al contrario que LC, la muestra no se puede introducir directamente en la columna, pues la vaporización instantánea del solvente provocaría un aumento excesivo de la presión del sistema. De este modo, se han desarrollado los inyectores *split/splitless*, que pueden operar con o sin división de flujo, los de temperatura de vaporización programada (PTV) y los inyectores *on-column*. Para llevar a cabo la determinación de trazas y ultratrazas, lo más habitual es preconcentrar los analitos en cabeza de columna mediante el modo *splitless* o en el

liner del inyector PTV, que al permitir la introducción de grandes volúmenes de muestra incrementan notablemente la sensibilidad.³

1.3. FUENTES DE IONIZACIÓN

A lo largo de este trabajo, debido a la diversidad de los analitos y muestras analizadas, se ha hecho uso de varias interfases para ionizar los compuestos procedentes del HPLC o GC e introducirlos en el analizador de masas. A continuación, se describen las principales características de cada uno de ellas.

El plasma de acoplamiento inductivo (ICP) es una fuente de iones atómicos monopositivos que se genera por una corriente de gas argón (de 8 a 20 L min⁻¹), denominado gas plasmógeno, que fluye a través de una antorcha de cuarzo constituida por tres canales concéntricos. Esta antorcha está rodeada en su extremo superior por una bobina de inducción conectada a un generador de radiofrecuencias (RF). Al aplicar a la bobina un potencial de RF (con una potencia entre 0.7 y 1.5 KW), se crea una corriente alterna que oscila a la frecuencia del generador (habitualmente 27 o 40 MHz). Esta oscilación origina en el interior de la antorcha un intenso campo electromagnético. Al aplicar una chispa de 1 Tesla se liberan algunos electrones de los átomos de argón que son acelerados por el campo electromagnético (acoplamiento inductivo). Estos electrones chocan con otros átomos de argón provocando nuevas ionizaciones y más electrones en una reacción en cadena que origina el plasma. Éste se mantiene en estado estacionario por el continuo aporte de energía de RF desde el generador. La muestra es introducida a través del canal central en forma de gas, vapor o como un fino aerosol. Este último se genera mediante un nebulizador neumático y una cámara de nebulización a presión atmosférica que selecciona el tamaño de gota medio óptimo (<10 µm). Aunque el tránsito a través del plasma se produce en milisegundos, la temperatura que alcanza (6000-8000 K) provoca casi la total destrucción de la matriz de la muestra y la disociación del analito en átomos, su excitación y su posterior ionización. La conexión del ICP a un analizador de masas ofrece elevada sensibilidad y selectividad, capacidad multielemental y la posibilidad de medir relaciones isotópicas. Cabe comentar que este acoplamiento no es sencillo y requiere un vacío diferencial, debido a que el plasma se encuentra a presión atmosférica mientras que el detector de masas opera a alto vacío.⁴

La interfase de ionización por electrospray (ESI) es una técnica de ionización a presión atmosférica que transfiere los iones desde la disolución a la fase gas. Consta de un capilar de acero inoxidable que se somete a un alto voltaje (del orden de 3-5 kV), a través del cual son conducidos los analitos disueltos en la fase móvil antes de pasar al analizador de masas. Por efecto del intenso gradiente de campo eléctrico, la corriente de líquido emerge del capilar de entrada y las moléculas de los analitos y del disolvente forman un aerosol de pequeñas gotas cargadas en un proceso de nebulización. La mayor parte de las moléculas de disolvente se evaporan (desolvatación) al atravesar la región a presión atmosférica de la fuente del espectrómetro de masas (a unos 120 °C). Dicha desolvatación es asistida además por una corriente de nitrógeno (a unos 350 °C). A medida que se evapora el disolvente, las gotas se hacen cada vez más pequeñas hasta que las fuerzas de repulsión entre cargas en la superficie son capaces de superar las fuerzas cohesivas de tensión superficial y se produce la ruptura final de la gota, originando iones en fase gaseosa (explosión de Coulomb). Dichos iones se transfieren a través de lentes focalizadoras al espectrómetro de masas. La fuente de ionización ESI permite trabajar a flujos del orden de $\mu\text{L}/\text{min}$ y está especialmente indicada para analitos polares, proporcionando el ion molecular protonado, desprotonado o aductos con moléculas de solvente. La formación de estos últimos no suele ser recomendable porque es poco reproducible y producen una disminución de la sensibilidad. Sin embargo, para moléculas sin ningún centro ácido o básico se suelen añadir modificadores en la fase móvil o en el vial para facilitar su formación, siendo los más comunes los aductos sodiados y amoniados. Otra ventaja de ESI es que permite generar iones policargados, lo que amplía su rango de aplicación a compuestos de elevado peso molecular como péptidos, oligonucleótidos y oligosacáridos. Por este motivo, ha sido ampliamente utilizada en estudios bioquímicos y biomédicos. No obstante, la interfase ESI presenta también una serie de limitaciones. Por un lado, proporciona poca información estructural, ya que al tratarse de un sistema de ionización muy suave genera pocos fragmentos. Asimismo, la sensibilidad es muy dependiente del flujo de fase móvil y del pH de ésta. Por último, la ionización mediante ESI es muy susceptible a sufrir efecto matriz, lo que provoca que se produzcan inhibiciones o exaltaciones indeseables de la señal.^{5,6}

La ionización electrónica (EI) es la interfase por excelencia para determinar compuestos volátiles y semi-volátiles. Se basa en la ionización de una corriente de gas mediante un haz de electrones generados por la emisión térmica de un filamento de wolframio o renio. Concretamente, los electrones son acelerados aplicando un potencial de 70 V y al cruzar la fuente de ionización, que está a alto vacío ($<10^{-6}$ mbar), colisionan con las moléculas neutras de analito. Si la energía de los electrones es superior al potencial de ionización de las moléculas de analito, generalmente 2-25 eV, estas se ionizarán y generarán el catión radical o ion molecular M^+ . En el proceso la molécula queda con exceso de energía, que se disipa mediante vibración, rotación y reordenación molecular. Como consecuencia de ello se produce la rotura de uno o varios enlaces. De esta manera se originan, para cada compuesto, una serie de iones positivos con diferente relación masa/carga (m/z) que son expulsados de la cámara de ionización hacia el analizador de masas. Así, siempre que se reproduzcan las condiciones de la ionización, las proporciones relativas del ion molecular y de los diferentes fragmentos producidos, conocido como espectro de masas, serán fijas y constituirán el patrón de fragmentación del analito. Dado que para 70 eV casi la totalidad de las moléculas orgánicas presentan la mayor eficiencia de ionización, se ha tomado este valor como condición estándar de trabajo para la creación de librerías, que permiten la identificación de infinidad de compuestos en la muestra problema. Sin embargo, en algunos casos la excesiva fragmentación de las moléculas provoca la desaparición del ion molecular en el espectro, dificultando de esta forma la identificación.^{5,6}

1.4. ANALIZADORES DE MASAS

Es la parte esencial y distintiva del espectrómetro de masas, pues de ella dependen la resolución, sensibilidad, rango de masas, velocidad de barrido y capacidad para la medida de masa exacta. Permite separar los diferentes iones en fase gaseosa que se han formado en la fuente de ionización en función de su relación m/z , requiriendo para ello un alto vacío (idealmente del orden de 10^{-6} torr). Como en todos los trabajos presentados se ha hecho uso de un cuadrupolo, simple o en tándem, este apartado se centra exclusivamente en este tipo de analizadores.

El analizador de iones cuadrupolar o cuadrupolo (Q) está formado por cuatro barras conductoras eléctricamente de sección cilíndrica o hiperbólica, alineadas entre sí y equidistantes una distancia r de un eje central imaginario. Las barras opuestas están conectadas y cada pareja está sometida a un potencial de corriente continua (U) de signo contrario. Además, a este potencial DC, se superpone otro potencial de radiofrecuencia (V) desfasado en 180° para cada par de barras (Figura 1.1). El filtrado se produce variando el valor absoluto de las amplitudes de cada potencial pero manteniendo constante la relación entre ellos (U/V). Así, el campo de radiofrecuencias oscilante generado en el interior de las cuatro barras provoca que los iones describan trayectorias sinusoidales, cuya amplitud depende de su relación m/z (ecuaciones de movimiento de Mathieu). Por lo tanto, sólo aquellos iones que posean una determinada relación m/z podrán llegar al detector, mientras que los de mayor o menor m/z serán rechazados. Entre sus principales ventajas destacan su alta transmisión de iones, buena respuesta lineal, rápida velocidad de barrido y bajo coste, comparado con otros analizadores como el sector magnético o tiempo de vuelo. Sin embargo, tiene baja resolución (1 Da), lo que impide que se puedan obtener espectros de masa exacta, y presenta una baja sensibilidad en modo de barrido de iones completo o *full scan*. En consecuencia, para fines cuantitativos se suele trabajar en modo *Selected Ion Monitoring (SIM)*, en donde sólo se seleccionan los iones de ciertas relaciones m/z .

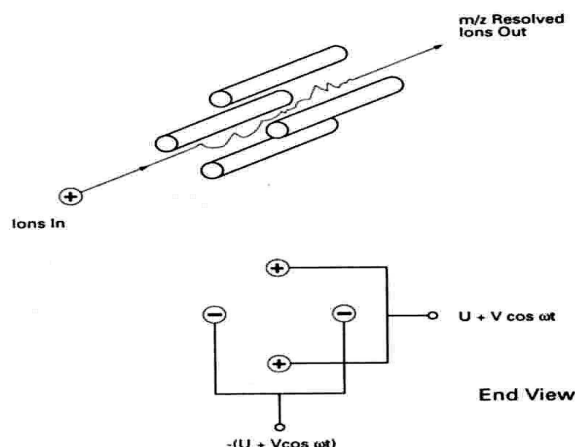


Figura 1.1. Esquema de un analizador de iones cuadrupolo. Se muestra una trayectoria y los tipos de voltaje aplicados.

A menudo, el uso de un cuadrupolo simple no es suficiente para asegurar que el pico obtenido corresponda al analito y no a otro compuesto isobárico presente en la matriz de la muestra que coeluye con éste. Esto sucede sobre todo cuando se utiliza una técnica de ionización suave tal como la interfase de electrospray en LC-MS, que al no inducir fragmentación no proporciona información estructural característica de la molécula. Asimismo, el análisis de muestras complejas con ionización electrónica y GC-MS a niveles de concentración muy bajos (sub-ppb) puede sufrir también este tipo de interferencias. Para aumentar la especificidad del análisis se hace uso de la espectrometría de masas en tándem (MS/MS). Se puede llevar a cabo en el espacio, usando varios analizadores, o en el tiempo, mediante un único analizador que permite la fragmentación del analito atrapado en su interior y la posterior separación de los fragmentos producidos. En el último trabajo de la presente tesis doctoral se ha utilizado un triple cuadrupolo (QqQ), que consiste en el acoplamiento en el espacio de dos analizadores cuadrupolares separados entre sí por un hexapolo que actúa como celda de colisión. De este modo, se utiliza el término "triple cuadrupolo" a pesar de que uno de ellos sea comúnmente un hexapolo y no cumpla funciones de analizador de masas. La fragmentación se produce cuando los iones seleccionados en el primer cuadrupolo (Q1) o iones precursores chocan con el gas inerte de la celda de colisión (Q2) y les confieren su energía translacional, que se transforma en parte en energía

vibracional de sus enlaces y provoca su disociación. Posteriormente, se miden en el segundo cuadrupolo (Q3) los iones generados o iones producto, que al ser específicos del analito están libres de interferencias isobáricas, proporcionando un mayor grado de fiabilidad en la identificación del analito. Los analizadores QqQ, además de trabajar en modo *SIM* y *full scan* como un solo analizador cuadrupolar, pueden operar en cuatro modos de MS/MS: *product ion scan*, *precursor ion scan*, *neutral loss* y *selected reaction monitoring (SRM)*. Este último se basa en la medida en modo *SIM* en Q1 y Q3, utilizando Q2 como celda de colisión. De esta forma, al monitorizar unas pocas transiciones características de cada compuesto, el modo *SRM* está especialmente indicado para llevar a cabo la cuantificación y confirmación simultánea de contaminantes orgánicos a nivel de trazas y ultratrazas. Además, se consigue un aumento notable de la especificidad del análisis y una mejora significativa de la relación *S/N*, debido a la considerable disminución del ruido químico.⁴

En caso de utilizar una interfase ICP, las moléculas de analito son disociadas en sus elementos constituyentes, lo que hace posible que se pueda monitorizar en el analizador de masas el ion monopositivo del metal o semi-metal que lo caracteriza. Sin embargo, esta instrumentación tampoco está exenta de interferencias espectrales. La presencia de otro elemento con un isótopo de la misma masa nominal o que genere un ion doblemente cargado con idéntica relación *m/z*, así como la formación de un ión poliatómico de la misma masa derivado de la combinación del gas del plasma, fase móvil y/o matriz de la muestra pueden contribuir a la señal. Para discriminar el ion en estudio del interferente poliatómico se han desarrollado las celdas de colisión/reacción, que consisten en un cuadrupolo, hexapolo u octopolo situado antes del analizador de masas cuadrupolar. Estas celdas pueden operar en dos modos distintos, dependiendo del gas utilizado. Cuando se emplea un gas reactivo, generalmente hidrógeno, éste induce una transferencia de masa o de carga en el interferente que modifica su relación *m/z*. Si se utiliza un gas inerte como el helio y se aplica un voltaje adecuado, éste colisionará preferentemente con las moléculas de interferente y como resultado de ello se disociará o perderá suficiente energía cinética como para ser discriminado. El primer método es específico de ciertos elementos y

puede conllevar la formación de nuevas interferencias, mientras que el segundo es más general y puede ser aplicado a todas las matrices y muestras utilizando las mismas condiciones analíticas, aunque suele provocar una disminución de la sensibilidad.⁷

1.5. ACOPLAMIENTOS INSTRUMENTALES UTILIZADOS

Como se ha comentado, las técnicas cromatográficas permiten separar los diferentes componentes de una mezcla según la extensión en que interaccionen con la fase estacionaria y la capacidad de elución de la fase móvil. Aunque el tiempo de retención es característico de cada compuesto, este único dato no es suficiente para asegurar su identificación en muestras complejas. Por otro lado, la espectrometría de masas proporciona información específica de cada sustancia pura. Sin embargo, no es capaz de identificar los componentes individuales de una mezcla, debido a la gran complejidad del espectro de masas resultante del solapamiento de los espectros de masas de cada uno de sus componentes. De esta forma, el uso de estas dos técnicas combinadas puede hacer posible la determinación inequívoca, sensible y rápida de un compuesto en muestras complejas. La elección del acoplamiento instrumental y de la interfase necesaria para ionizar los compuestos e introducirlos en el analizador de masas será función del tipo de análisis, la naturaleza de la muestra y los analitos determinados. En este sentido, a lo largo del presente trabajo se han utilizado diferentes combinaciones de técnicas cromatográficas y fuentes de ionización con el analizador cuadrupolar, dependiendo de la aplicación. A continuación, se describen brevemente cada uno de estos acoplamientos.

1.5.1. LC-ICP-MS (Q)

Este acoplamiento es el más indicado para llevar a cabo la determinación de especies de elementos metálicos o semi-metálicos, especialmente si son iónicas. La salida de la columna se conecta directamente a la entrada del nebulizador del ICP mediante un capilar de PEEK o PFA. Las diferentes especies, una vez separadas en la columna cromatográfica, sufren un proceso de desolvatación, vaporización, atomización e ionización en el plasma que permite la detección del elemento característico del compuesto. En consecuencia, la respuesta analítica vendrá dada sólo por ese elemento, lo que simplifica de manera extraordinaria los cromatogramas resultantes y elimina las interferencias de los potenciales compuestos orgánicos de la misma masa nominal que coeluyen. Puesto que la señal es característica del elemento monitorizado e independiente del compuesto del que proceda, el uso de LC-ICP-MS hará posible la detección y cuantificación de especies desconocidas del elemento de estudio sin necesidad de disponer de patrones. Sin embargo, el uso de una fuente de ionización de plasma presenta algunos inconvenientes. Durante el proceso de atomización se pierde toda la información molecular y estructural, de manera que la identificación de las especies se basa exclusivamente en su tiempo de retención. Este hecho hace que la cromatografía adquiera especial importancia, ya que cualquier solapamiento entre especies no podrá ser resuelto posteriormente en el ICP-MS. Por otro lado, cualquier contaminación del elemento medido procedente de los componentes metálicos del sistema cromatográfico (bomba, válvulas, conexiones) o de los reactivos utilizados en la fase móvil, contribuirán a la señal y podrán conducir a cuantificaciones erróneas. Además, el plasma es incompatible con el uso de elevados contenidos de disolvente orgánico, que a menudo son requeridos para conseguir la elución de compuestos organometálicos.

Teniendo en cuenta todas estas ventajas y limitaciones, se ha escogido el acoplamiento LC-ICP-MS para desarrollar diferentes métodos de especiación basados en intercambio iónico para As y Se en aguas medioambientales (**artículos científicos 1 y 2**) y As en orina humana (**artículo científico 3**), y para la especiación de Hg en aguas medioambientales basado en fase inversa (**artículo científico 4**).

1.5.2. LC-ESI-MS/MS (QqQ)

Debido al amplio rango de compuestos susceptibles de ser separados mediante LC, la gran variedad de soportes cromatográficos disponibles y la posibilidad de inyectar directamente extractos acuosos, su acoplamiento a la espectrometría de masas aparece como una prometedora herramienta para la determinación de contaminantes orgánicos polares a niveles de concentración muy bajos. Sin embargo, la incompatibilidad entre el caudal de líquido procedente del LC y el elevado vacío necesario en MS retrasó largamente su aparición. Este problema fue solventado con el desarrollo de las interfases a presión atmosférica (APIs), que convierten el caudal de líquido en fase gaseosa y se caracterizan por la formación de los iones fuera de la zona de alto vacío. De esta forma, el eluato procedente de la columna cromatográfica es conducido directamente a la fuente de ionización, a través de un capilar de PEEK, donde dependiendo de su carácter ácido o básico se ioniza para formar su correspondiente ion molecular protonado $[M+H]^+$ o desprotonado $[M-H]^-$. Posteriormente, el uso de espectrometría de masas en tándem hace posible diferenciar el analito de los interferentes isobáricos que puedan eluir al mismo tiempo de retención. La medida de una transición característica del analito mediante el modo SRM, que no comparten los interferentes, permite su identificación inequívoca y disminuye enormemente los límites de detección. Estas ventajas, junto con su rapidez y capacidad de determinar moléculas de elevado peso molecular sitúan a LC-ESI-MS/MS como una de las principales técnicas en numerosos campos analíticos, como el medioambiental, toxicológico y alimentario. A pesar de ello, los métodos basados en este acoplamiento no están exentos de limitaciones. La coelución de otros compuestos presentes en la matriz puede causar la exaltación o supresión de la señal, conduciendo a cuantificaciones erróneas. Para corregir este efecto matriz se han utilizado diferentes estrategias como la eliminación de estos interferentes mediante tratamiento de muestra, calibrado en matriz, uso de patrones internos, adiciones estándar o la simple dilución de la muestra. De entre todas estas correcciones la más indicada consiste en el uso de patrones internos marcados isotópicamente, que al ser estructuralmente idénticos al analito de interés presentan prácticamente el mismo comportamiento físico-químico.

En el **artículo científico 6** se ha hecho uso de un compuesto marcado isotópicamente para desarrollar un método basado en el acoplamiento LC-ESI-MS/MS que no requiere curva de calibrado.

1.5.3. GC-ICP-MS (Q)

De manera análoga a LC-ICP-MS, este acoplamiento se basa en la medida del metal o semi-metal característico de las especies en estudio después de que sean separadas por cromatografía de gases. En este caso, los analitos deben ser volátiles o semi-volátiles y térmicamente estables o ser capaces de formar un compuesto con estas características. Las reacciones de derivatización pueden incluir la generación de hidruros, etilación, propilación, butilación o pentilación. La conexión entre ambas técnicas no es sencilla, ya que los analitos deben mantenerse en forma gaseosa, evitando que se produzca cualquier condensación que provoque ensanchamiento de los picos. Para ello, se propuso una línea de transferencia desde la salida de la columna hasta la antorcha del ICP consistente en un tubo rígido metálico calentado a lo largo de toda su longitud. Sin embargo, su elevado coste y el hecho de que precise un complicado y laborioso montaje han motivado que se desarrollen otros sistemas alternativos, como el basado en un tubo de PFA a temperatura ambiente con una corriente de arrastre de argón.⁸ Estas líneas de transferencia, mucho más sencillas, económicas y flexibles han impulsado en estos últimos años el uso de GC-ICP-MS para llevar a cabo la especiación de diferentes compuestos organometálicos. Puesto que toda la muestra procedente del GC es introducida directamente en el plasma, sin necesidad de utilizar un sistema de drenaje como ocurre cuando se conecta un LC, los métodos basados en este acoplamiento presentan una elevada sensibilidad y no suelen precisar una etapa de preconcentración previa. Además, el menor error asociado a la línea base, así como las pequeñas anchuras de pico típicamente obtenidas (4-6 s), le confieren mejores precisiones y límites de detección. No obstante, los tiempos totales de análisis suelen ser mucho mayores. Por un lado, el gradiente de temperatura utilizado en las separaciones origina que haya un periodo de enfriamiento entre inyecciones de algunos minutos. Por otro lado, antes de llevar a cabo la separación/determinación suele ser necesaria una etapa de extracción de los analitos de la matriz mediante LLE o SPE. Cabe señalar que para corregir los procesos no cuantitativos derivados del tratamiento de muestra hay que calcular el rendimiento de cada una de esas etapas o hacer uso de un *surrogate* adecuado.

En el **artículo científico 5** se ha hecho uso de la técnica híbrida GC-ICP-MS para comprobar la validez de un procedimiento de especiación de Hg(II) y MeHg en tejidos de pescado desarrollado para GC-MS.

1.5.4. GC-EI-MS (Q)

El principal requisito para llevar a cabo este acoplamiento reside en mantener el elevado vacío que requiere el analizador de masas. Con la aparición de las columnas capilares la conexión entre las dos técnicas se ha simplificado enormemente, ya que los menores caudales utilizados ($1\text{-}2\text{ mL min}^{-1}$) pueden ser introducidos directamente en la cámara de ionización. Los compuestos procedentes del cromatógrafo de gases se ionizan y fragmentan en la interfase de ionización electrónica originando un espectro característico. La existencia de librerías para EI en las condiciones estándar de trabajo de 70 eV combinado con el dato del tiempo de retención, permite asignar con elevada fiabilidad cada uno de los picos cromatográficos de la muestra a un compuesto determinado. Sin embargo, el grado de especificidad alcanzado no siempre es suficiente, especialmente en el análisis de muestras de matriz compleja. En estos casos, es necesario realizar una etapa previa de purificación para eliminar los interferentes, que se suma a las de extracción, derivatización y preconcentración que frecuentemente se incluyen en los métodos basados en GC-EI-MS. Todo ello, provoca un incremento notable del tiempo total de análisis y supone un riesgo de contaminación adicional. De la misma manera que para GC-ICP-MS, se deben corregir también las posibles pérdidas o ganancias de analito derivadas de cada una de dichas etapas.

Dado que GC-EI-MS es una de las técnicas híbridas más extendidas, se ha desarrollado un método alternativo al acoplamiento GC-ICP-MS (más caro y sofisticado) para la determinación simultánea de Hg(II) y MeHg en tejidos de pescado en laboratorios de ensayo (**artículo científico 5**).

1.6. ANÁLISIS POR DILUCIÓN ISOTÓPICA

El análisis por dilución isotópica (IDA) es una técnica analítica basada en la medida de las relaciones isotópicas en muestras cuya composición isotópica ha sido previamente alterada mediante la adición de una cantidad conocida de un elemento o compuesto enriquecido isotópicamente. Para esta técnica no es requisito el uso de calibrado metodológico. En estas condiciones puede considerarse un método primario, directamente trazable al sistema internacional de unidades y de elevada calidad metrológica. En determinaciones elementales totales se suele utilizar un ICP-MS, principalmente por la buena precisión y exactitud que proporciona en la medida de las relaciones isotópicas del metal.⁹ En cambio, la mayor parte de las aplicaciones de IDA en análisis orgánico y bioquímico emplean compuestos marcados con ^{13}C o deuterio e implican el uso de una técnica de separación cromatográfica acoplada a espectrometría de masas molecular.^{10,11}

En los últimos años se han aplicado metodologías basadas en el análisis por dilución isotópica a nuevos campos analíticos, entre los que destaca la especiación elemental.^{12,13} Este análisis consiste en la identificación y determinación individual de las formas químicas en las que se distribuye un elemento en una muestra dada. Esta nueva aplicación ha solapado de alguna manera la dilución isotópica elemental con la orgánica. Los isótopos enriquecidos que se emplean en este tipo de aplicaciones son aquellos tradicionalmente empleados en IDA elemental (isótopos de Pb, Sn, Hg, Se, Cr, etc.), aunque en este caso la medida de las relaciones isotópicas no sólo se lleva a cabo mediante ICP-MS, sino que también se pueden emplear fuentes de ionización moleculares acopladas a analizadores de masas.¹⁴ Gracias a que estos elementos presentan varios isótopos estables, es posible marcar cada una de las especies con un isótopo distinto, lo que permite evaluar y corregir las reacciones de interconversión que se producen frecuentemente durante el análisis.¹⁵⁻¹⁸

En la Figura 1.2 se ilustra el fundamento de IDA para un elemento que contiene dos isótopos *a* y *b*. Como se puede observar, el isótopo *a* es el más abundante en la muestra mientras que el trazador está enriquecido con el isótopo *b*. Al mezclar ambas disoluciones, las abundancias isotópicas resultantes (y en consecuencia, las relaciones

isotópicas) serán intermedias entre las de la muestra y el trazador, dependiendo tanto de la cantidad de elemento endógeno como de trazador adicionado.

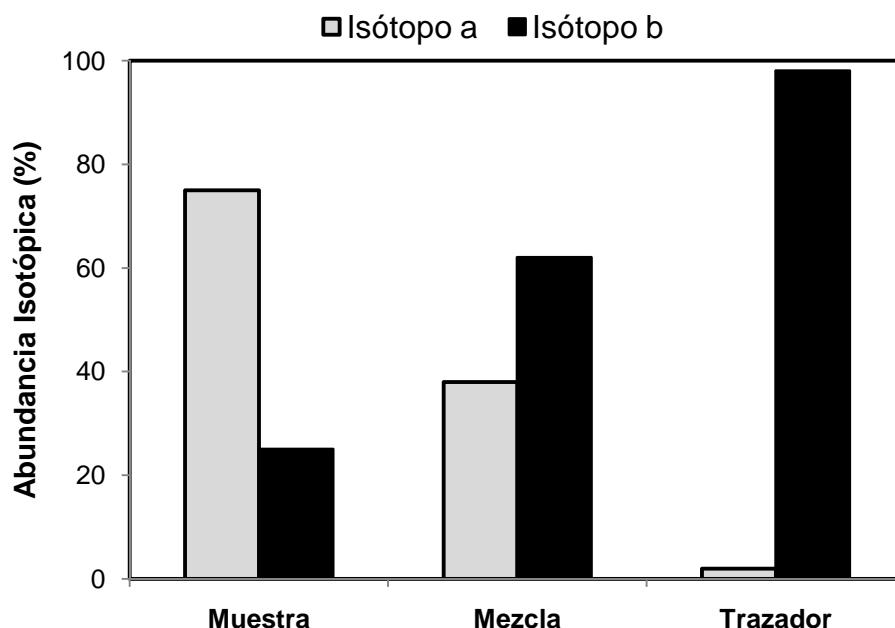


Figura 1.2. Ilustración del principio del análisis por dilución isotópica para un elemento con dos isótopos (a y b).

El uso de IDA presenta las siguientes ventajas respecto al resto de técnicas de cuantificación (p. ej. calibrado externo o adiciones estándar):

- Puesto que la relación isotópica es independiente de la sensibilidad instrumental, los resultados obtenidos no se verán afectados por la deriva de la señal ni por el efecto matriz.
- La incertidumbre en la medida de la concentración de analito dependerá sólo de la incertidumbre de la medida de las relaciones isotópicas, que pueden ser determinadas con elevada exactitud y precisión en un espectrómetro de masas.
- Como los compuestos marcados isotópicamente poseen las mismas propiedades físico-químicas que los de abundancia natural, una vez alcanzado el equilibrio isotópico entre la muestra y trazador cualquier pérdida de

sustancia de la mezcla no va a tener ninguna influencia en el resultado final. Como consecuencia de ello, no será necesario conocer los factores de preconcentración realizados ni tener en cuenta las etapas de tratamiento de muestra no cuantitativas.

Todas estas ventajas convierten al análisis por dilución isotópica en un método de referencia. Sin embargo, hay una serie de requisitos que se deben tener en cuenta para obtener un valor exacto de la concentración inicial del elemento en la muestra. Por un lado, hay que evitar cualquier pérdida de sustancia (de muestra o de trazador) antes de que se produzca el equilibrio isotópico. Posteriormente, el compuesto natural y el marcado isotópicamente deben comportarse de manera idéntica a lo largo de todo el procedimiento analítico. Además, las intensidades de los isótopos a y b medidas en el espectrómetro de masas deben estar libres de interferencias espectrales y se deben tener en cuenta la discriminación de masas y el tiempo muerto del detector. Por último, se han de controlar cuidadosamente los valores de concentración de los blancos, ya que cualquier tipo de contaminación que afecte a la muestra fortificada conducirá a valores experimentales erróneos de la relación isotópica.¹⁹

Dependiendo del momento y la forma química en que se añade el trazador a la muestra se pueden distinguir dos modalidades de fortificación de especies, inespecífica y específica.

1.6.1. Dilución isotópica inespecífica

Esta modalidad es especialmente útil cuando no se conoce exactamente la estructura de las especies que se quieren determinar o cuando no se dispone o no se pueden sintetizar los correspondientes compuestos marcados isotópicamente. Consiste en añadir el trazador después de que tenga lugar la separación de las especies del elemento natural procedentes de la muestra (fortificación post-columna). En este caso, se puede utilizar un marcado en una forma química distinta de la de analito. Para ello, es indispensable que la eficiencia de ionización del elemento sea independiente de la naturaleza de las especies en que se encuentra el elemento, lo que se consigue con un ICP-MS. Este modo de fortificación no ofrece todas las ventajas comentadas anteriormente, ya que cualquier pérdida de analito previa a la separación cromatográfica conduciría a resultados erróneos.

El primer método basado en análisis por dilución isotópica post-columna fue propuesto por Heumann *et al.* para cuantificar las especies de un elemento previamente separadas por cromatografía líquida.²⁰ En la actualidad esta modalidad se ha extendido a la determinación de proteínas, al acoplamiento GC-ICP-MS y al uso de otras fuentes de ionización como en el procedimiento para el análisis orgánico mediante la adición post-columna de $^{13}\text{CO}_2$ y equilibración isotópica usando una celda de combustión y el acoplamiento GC-MS.²¹ La representación del flujo másico, que se calcula midiendo la relación isotópica correspondiente en todo el cromatograma, frente al tiempo proporciona la cantidad de masa del elemento en cada pico. A continuación se describen las ecuaciones necesarias para llevar a cabo la cuantificación.

El eluato, que es bombeado a un flujo f_s (mL min^{-1}), contiene N_s (mol g^{-1}) del elemento natural procedente de la muestra (con densidad d_s en g mL^{-1}). Después de la separación cromatográfica, se le añade una disolución con N_t (mol g^{-1}) del elemento marcado y densidad d_t (g mL^{-1}) a un flujo f_t (mL min^{-1}). El flujo total para dos isótopos, a y b , del elemento en la mezcla (m) está dado por:

$$N_m^a d_m f_m = N_s^a d_s f_s + N_t^a d_t f_t \quad (1)$$

$$N_m^b d_m f_m = N_s^b d_s f_s + N_t^b d_t f_t \quad (2)$$

siendo a el isótopo más abundante en la muestra y b el isótopo más importante en el trazador.

Dividiendo la ec. (1) entre la ec. (2) se obtiene la siguiente expresión:

$$R_m = \frac{N_s^a d_s f_s + N_t^a d_t f_t}{N_s^b d_s f_s + N_t^b d_t f_t} = \frac{N_s A_s^a d_s f_s + N_t A_t^a d_t f_t}{N_s A_s^b d_s f_s + N_t A_t^b d_t f_t} \quad (3)$$

siendo $R_m = N_m^a / N_m^b$ la relación isotópica (a/b) en la mezcla. Teniendo en cuenta las abundancias isotópicas para los isótopos a y b en la muestra (A_s^a y A_s^b) y en el trazador (A_t^a y A_t^b), $N_s^a = N_s A_s^a$, $N_t^a = N_t A_t^a$, $N_s^b = N_s A_s^b$ y $N_t^b = N_t A_t^b$.

Si se reorganiza la ec. (3):

$$N_s d_s f_s = N_t d_t f_t \frac{R_m A_t^b - A_t^a}{A_s^a - R_m A_s^b} \quad (4)$$

que es la ecuación básica de la dilución isotópica para fortificación *on-line*.

Definiendo $R_s = \frac{A_s^b}{A_s^a}$ como la relación isotópica (b/a) en la muestra y $R_t = \frac{A_t^a}{A_t^b}$ la relación isotópica (a/b) en el trazador, la ec. (4) puede expresarse como:

$$N_s d_s f_s = N_t d_t f_t \frac{A_t^b}{A_s^a} \left(\frac{R_m - R_t}{1 - R_m R_s} \right) \quad (5)$$

Las concentraciones en mol g^{-1} pueden ser expresadas como concentraciones en peso teniendo en cuenta el peso atómico del elemento, dando lugar a la siguiente expresión:

$$c_s d_s f_s = c_t d_t f_t \frac{AW_s}{AW_t} \frac{A_t^b}{A_s^a} \left(\frac{R_m - R_t}{1 - R_m R_s} \right) \quad (6)$$

donde c_s y c_t son las concentraciones del elemento en la muestra y en la disolución de marcado (ng g^{-1}), respectivamente, y AW_s y AW_t son los correspondientes pesos atómicos del elemento natural y marcado.

La expresión $c_s d_s f_s$ tiene unidades de ng min^{-1} y es el flujo másico de la muestra que eluye de la columna, MF_s . Por tanto, la ecuación final de dilución isotópica toma la forma:

$$MF_s = c_t d_t f_t \frac{AW_s}{AW_t} \frac{R_m A_t^b - A_t^a}{A_s^a - R_m A_s^b} \quad (7)$$

Si la concentración de analito cambia con el tiempo, por ejemplo, durante el pico cromatográfico, MF_s también cambiará con el tiempo. La integración del pico en el cromatograma de flujo másico proporcionará la cantidad del metal determinado en esa fracción. Por último, la concentración se puede calcular fácilmente conociendo el volumen de muestra inyectado.

1.6.2. Dilución isotópica específica

Esta modalidad se utiliza cuando se conoce la estructura de la especie que se quieren determinar y se dispone del correspondiente compuesto marcado. La fortificación se realiza al inicio del proceso analítico, de manera que una vez se alcanza el equilibrio isotópico se obtienen todas las ventajas que ofrece el análisis por dilución isotópica. Si se tienen que determinar varias especies de un mismo elemento, cada compuesto se puede enriquecer en un isótopo distinto, lo que permite corregir también las reacciones de interconversión entre especies. Este procedimiento es análogo a la determinación tradicional de compuestos orgánicos mediante dilución isotópica, aunque en lugar de utilizar compuestos deuterados o con ^{13}C se marca el heteroátomo de la molécula y no se hace uso de curva de calibrado.¹⁹

En los últimos años se ha producido un importante avance en el procedimiento de cálculo para el análisis por dilución isotópica en especiación de elementos traza. El principal cambio radica en el uso de las abundancias isotópicas en lugar de las relaciones isotópicas. Esta modificación permite simplificar los cálculos cuando se utilizan trazadores múltiples. Además, si se miden más isótopos que los estrictamente necesarios, es posible corregir la discriminación de masa o las interferencias espectrales utilizando sólo la inyección de muestra, lo cual es extensible al empleo de un solo trazador. Este procedimiento recibe el nombre de Deconvolución de Perfiles Isotópicos (IPD) y consiste en descomponer el perfil isotópico medido de la muestra fortificada en sus componentes originales (perfil natural y del trazador/es) mediante regresión lineal multivariante. Para ello, se hace uso de toda o parte de la distribución isotópica del elemento o compuesto a determinar.²² Suponiendo que una muestra se fortificase con dos trazadores, la mezcla presentaría una composición isotópica con tres perfiles isotópicos: el de abundancia natural de la muestra (s) y los marcados isotópicamente de los dos trazadores ($t1$ y $t2$). Lo más habitual es añadir los patrones marcados al mismo tiempo para corregir las reacciones de interconversión, aunque también se pueden añadir en distintas etapas, utilizando uno de ellos como trazador metabólico y el otro como trazador de cuantificación.²³ En este ejemplo explicativo consideraremos el segundo caso para simplificar en lo posible la deducción de las

ecuaciones. Después de añadir los patrones marcados, se puede plantear el siguiente balance molar total para cualquier alícuota de la muestra:

$$N_m = N_s + N_{t1} + N_{t2} \quad (8)$$

donde N_m es el número total de moles del elemento o compuesto en la muestra y N_s , N_{t1} y N_{t2} el número total de moles para cada uno de los tres perfiles isotópicos.

El balance molar anterior se puede calcular para cada uno de los iones del *cluster* del elemento o compuesto. Así, para un ion con masa i se obtendría:

$$N_m^i = N_s^i + N_{t1}^i + N_{t2}^i \quad (9)$$

La ec. (9) se puede expresar como una combinación lineal de los moles totales de cada perfil isotópico y su correspondiente distribución isotópica:

$$N_m A_m^i = N_s A_s^i + N_{t1} A_{t1}^i + N_{t2} A_{t2}^i \quad (10)$$

donde A_m^i es la abundancia relativa medida del elemento o compuesto a la masa nominal i en la mezcla y A_s^i , A_{t1}^i y A_{t2}^i las abundancias relativas teóricas a la misma masa nominal para cada uno de los perfiles isotópicos considerados. Si se divide la ec. (10) entre la ec. (8), se llega a la siguiente expresión:

$$A_m^i = x_s A_s^i + x_{t1} A_{t1}^i + x_{t2} A_{t2}^i \quad (11)$$

donde

$$x_s = \frac{N_s}{N_m} \quad (12)$$

$$x_{t1} = \frac{N_{t1}}{N_m} \quad (13)$$

$$x_{t2} = \frac{N_{t2}}{N_m} \quad (14)$$

son las fracciones molares del elemento o compuesto con abundancia natural y marcados isotópicamente que contribuyen al perfil isotópico observado en la muestra fortificada.

Planteando la ec. (11) a las n masas que constituyen el *cluster* espectral y expresándolas en notación matricial, se obtiene:

$$\begin{bmatrix} A_m^1 \\ A_m^2 \\ A_m^3 \\ \dots \\ A_m^{n-1} \\ A_m^n \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} A_s^1 & A_{t1}^1 & A_{t2}^1 \\ A_s^2 & A_{t1}^2 & A_{t2}^2 \\ A_s^3 & A_{t1}^3 & A_{t2}^3 \\ \dots & \dots & \dots \\ A_s^{n-1} & A_{t1}^{n-1} & A_{t2}^{n-1} \\ A_s^n & A_{t1}^n & A_{t2}^n \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} x_s \\ x_{t1} \\ x_{t2} \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} e^1 \\ e^2 \\ e^3 \\ \dots \\ e^{n-1} \\ e^n \end{bmatrix} \quad (15)$$

Cuando $n > 3$, el sistema sobredeterminado de ecuaciones se puede resolver mediante regresión lineal multivariante, realizando el ajuste por mínimos cuadrados del vector error 'e'. En esos casos, los grados de libertad extra pueden ser utilizados para corregir errores sistemáticos como la discriminación de masa y/o las interferencias espectrales.

Si $t2$ es el trazador utilizado para cuantificar, la relación de su fracción molar con la de los otros perfiles isotópicos proporcionará las ecuaciones de dilución isotópica, ya que N_{t2} es conocido:

$$\frac{x_s}{x_{t2}} = \frac{N_s}{N_{t2}} \quad \text{y} \quad \frac{x_{t1}}{x_{t2}} = \frac{N_{t1}}{N_{t2}}$$

Estas dos ecuaciones permiten determinar el número de moles de elemento o compuesto con abundancia natural (s) y de trazador metabólico ($t1$) contenido en la muestra después de la adición de una cantidad conocida de $t2$.

Cuando la detección se lleva a cabo mediante espectrometría de masas atómica, el marcaje isotópico reside en el heteroátomo de la molécula, así que en los cálculos por IPD se utilizan las abundancias isotópicas elementales. En cambio, en espectrometría de masas molecular se utiliza la distribución de isotopómeros de masa del compuesto, pudiendo introducir el marcaje en cualquiera de los elementos que lo conforman.

1.7. BIBLIOGRAFÍA

1. Ure, A.M.; Davidson, C.M. *Chemical speciation in the environment*, Blackwell, Oxford, 2nd edition, **2002**.
2. Snyder, L.R.; Kirkland, J.J.; Dolan, J.W. *Introduction to modern liquid chromatography*, Ed. Wiley & Sons, **2009**.
3. Poole, C.F. *The essence of chromatography*, Ed. Elsevier, **2003**.
4. Hoffman, E.; Strooband, V. *Mass spectrometry: Principles and applications*. John Wiley & Sons, New York. 2nd edition, **2002**.
5. Gross, M.L.; Caprioli, R.M. *The encyclopedia of mass spectrometry. Volume 6: Ionization methods*. Elsevier, New York, **2007**.
6. Gross, J.H. *Mass spectrometry. A textbook*. Springer-Verlag, Berlin, **2004**.
7. Thomas, R. *Practical guide to ICP-MS: a tutorial for beginners*, CRC Press. Boca Raton, 2nd edition, **2008**.
8. Montes-Bayón, M.; Gutiérrez Cambor, M.; García; Alonso, J.I.; Sanz-Medel, A. J. Anal. *An alternative GC-ICP-MS interface design for trace element speciation*. Atom. Spectrom. **1999**, 14, 1317–1322.
9. Heumann, K. *Isotope-dilution ICP-MS for trace element determination and speciation from a reference method to a routine method?* Anal. Bioanal. Chem. **2004**, 378, 318-329.
10. Mechlinska, A.; Wolska, L.; Namiesnik; J. *Isotope-labeled substances in analysis of persistent organic pollutants in environmental samples*. Trends Anal. Chem. **2010**, 29, 820-831.
11. Thienpont, L.M.; Stoeckl, D.; De Leenheer, A.P. *Isotope dilution mass spectrometry and implementation of a common accuracy base for routine medical laboratory analysis: practice and prospects*. J. Mass Spectrom. **1995**, 30, 772-774.
12. Popp, M.; Hann, S.; Koellensperger, G. *Environmental application of elemental speciation analysis based on liquid or gas chromatography hyphenated to*

- inductively coupled plasma mass spectrometry—A review*. Anal. Chim. Acta **2010**, 668, 114-129.
13. Harrington, C.F.; Clough, R.; Hansen, H.R.; Hill, S.J.; Pergantis, S.A.; Tyson, F. *Atomic spectrometry update. Elemental speciation*. J. Chromatogr. A **2009**, 24, 999-1025.
 14. Centineo, G.; Rodríguez-González, P.; Blanco González, E.; García Alonso, J.I.; Sanz-Medel, A.; Cardona, N.F.; Aranda Mares, J.L.; Nebot, S.B. *Isotope dilution GC-MS routine method for the determination of butyltin compounds in water*. Anal. Bioanal. Chem. **2006**, 384, 908-914.
 15. Ouerdane, L.; Mester, Z.; Meija, J. *General equation for multiple spiking isotope dilution mass spectrometry*. Anal. Chem. **2009**, 81, 5075-5079.
 16. Ma, H.-L.; Tanner, P.A. *Speciated isotope dilution analysis of Cr(III) and Cr(VI) in water by ICP-DRC-MS*. Talanta **2008**, 77, 189-194.
 17. Rodríguez-González, P.; García Alonso, J.I.; Sanz-Medel, A. *Single and multiple spike procedures for the determination of butyltin compounds in sediments using isotope dilution GC-ICP-MS*. J. Anal. At. Spectrom. **2005**, 20, 1076-1084.
 18. Rahman, G.M.M.; Kingston, H.M. *Application of speciated isotope dilution mass spectrometry to evaluate extraction methods for determining mercury speciation in soils and sediments*. Anal. Chem. **2004**, 76, 3548-3555.
 19. Rodríguez-González, P.; Marchante-Gayón, J.M.; García Alonso, J.I.; Sanz-Medel, A. *Isotope dilution analysis for elemental speciation: A tutorial review*. Spectrochim. Acta Part B **2005**, 60, 151-207.
 20. Rottmann, L.; Heumann, K.G. *Development of an on-line isotope dilution technique with HPLC/ICP-MS for the accurate determination of elemental species*. Fresenius' J. Anal. Chem. **1994**, 350, 221-227.
 21. Cueto, S.C.; Encinar, J.R.; Sanz-Medel, A.; García-Alonso, J.I. *Gas chromatography-combustion-mass spectrometry with postcolumn isotope dilution for compound-independent quantification: its potential to assess HS-SPME procedures*. Anal. Chem. **2009**, 82, 6862-6869.

22. Rodríguez-González, P.; García Alonso, J.I. *Recent advances in isotope dilution analysis for elemental speciation*. J. Anal. At. Spectrom. **2010**, 25, 239-259.
23. González Iglesias, H.; Fernández Sánchez, M.L.; Rodríguez-Castrillón, J.A.; García-Alonso, J.I.; López Sastre, J.; Sanz-Medel, A. *Enriched stable isotopes and isotope pattern deconvolution for quantitative speciation of endogenous and exogenous selenium in rat urine by HPLC-ICP-MS*. J. Anal. At. Spectrom. **2009**, 24, 460-468.

CAPÍTULO 2

Especiación de As en muestras de agua medioambiental y orina humana

CAPÍTULO 2. ESPECIACIÓN DE As EN MUESTRAS DE AGUA MEDIOAMBIENTAL Y ORINA HUMANA

2.1.	Introducción.....	41
2.2.	Interacciones adicionales de los grupos –OH de las especies de As y Se con los capilares de sílice fundida en micro-cromatografía líquida de intercambio aniónico.....	51
2.2.1.	Bibliografía.....	53
2.2.2.	Artículo científico 1.....	55
	“Secondary interactions, an unexpected problem emerged between hydroxyl containing analytes and fused silica capillaries in anion-exchange micro-liquid chromatography”	
	J. Chromatogr. A, 1172 (2007) 179–185	
2.3.	Potencial de las columnas microbore acopladas a ICP-MS en especiación de As y Se.....	73
2.3.1	Bibliografía.....	76
2.3.2	Artículo científico 2.....	79
	“Capabilities of microbore columns coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry in speciation of arsenic and selenium”	
	J. Chromatogr. A, 1202 (2008) 132–137	
2.4.	Aplicación del método de especiación desarrollado al estudio de la presencia de As y Se en el acuífero de la Plana de Castellón.....	99
2.5.	Determinación de As inorgánico en muestras ácidas.....	105
2.5.1.	Bibliografía.....	109
2.6.	Especiación de As en orina humana basada en pseudo-dilución isotópica	

inespecífica mediante el uso de Ge como patrón interno.....	111
2.6.1. Bibliografía.....	114
2.6.2. Artículo científico 3.....	117
<p>“Rapid screening of arsenic species in urine from exposed human by inductively coupled plasma mass spectrometry with germanium as an internal standard”</p> <p>J. Anal. At. Spectrom., 27 (2012) 354-358</p>	

2.1. INTRODUCCIÓN

El arsénico es un elemento ubicuo en la naturaleza y ocupa el vigésimo puesto en abundancia en la corteza terrestre, con un nivel entre 1 y 2 mg kg⁻¹. Con un número atómico de 33 y un peso atómico de 74.9216 presenta un solo isótopo estable, ⁷⁵As. En estado elemental puede presentar tres estados alotrópicos: gris o metálico (forma α), negro (forma β) y amarillo (forma γ), comportándose en estos dos últimos estados de agregación como un no metal. El arsénico existe en cuatro estados de oxidación, -3 (arsina), 0 (arsénico), +3 (arsenito) y +5 (arseniato).¹⁻³ Suele encontrarse asociado a minerales sulfurosos de hierro y otros tantos metales (tales como Au, Ag, Cu, Sb, Ni y Co). Los más comunes son la arsenopirita (FeAsS), oropimente (As₂S₃) y realgar (AsS). Su presencia en medios hidrotermales se debe tanto a actividades volcánicas recientes como antiguas. Los niveles de arsénico en la atmósfera tienen como origen los procesos de erosión del viento, emisiones volcánicas, aerosoles marinos, incendios forestales y volatilizaciones a baja temperatura, principalmente como consecuencia de procesos biológicos como la biometilación. Puesto que es un elemento ampliamente extendido, no es de extrañar que se encuentre en los organismos vivos a elevadas concentraciones. Por ejemplo, en las plantas, donde el contenido de arsénico está directamente relacionado con la concentración en el suelo, los niveles están comprendidos entre 0.001 y 5 µg de arsénico por gramo de materia seca, dependiendo de la especie y tipo de suelo.^{1,4} Además, la actividad humana ha incrementado notablemente su presencia en el medioambiente.⁵ En efecto, el uso de combustibles fósiles ricos en As produce trióxido de arsénico, altamente tóxico, que es liberado a la atmósfera en grandes cantidades, precipitando posteriormente en forma de lluvia o polvo. Por otro lado, un gran número de compuestos de este elemento han sido ampliamente utilizados como plaguicidas, pigmentos, conservantes de la madera,

en la manufacturación del vidrio, en la industria textil, metalurgia... e incluso en la industria farmacéutica.^{1,3,4} También hay que destacar la importante aportación de As al medioambiente provocada por la minería, como consecuencia de la lixiviación de las aguas residuales ácidas generadas en la industria minera.⁶

Una vez liberado en el medio ambiente puede entrar en contacto con el ser humano bien de forma directa o a través de la cadena trófica, pudiendo provocar desde lesiones en la piel hasta tumores cerebrales, cáncer de hígado, riñón y estómago. Debido a su toxicidad, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha establecido un nivel máximo de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ en agua potable.⁷ En todo caso, la toxicidad y biodisponibilidad del arsénico depende de la forma química en que se encuentra.⁸⁻¹¹ Así, los compuestos inorgánicos de As(III) están considerados entre 60-80 veces más tóxicos en lo humanos que los correspondientes de As(V).⁴ Este hecho se debe a que el arsenito se enlaza más eficientemente con los grupos sulfhidrilos de muchas encimas, inhibiendo su actividad y provocando diversas discapacidades funcionales. El arseniato tiene una estructura análoga al ion fosfato, por lo que compite con este último causando numerosas alteraciones a nivel celular.^{1,7} La arsenobetaina (AsB) y arsenocolina (AsC), presentes en algunos alimentos marinos a elevadas concentraciones, son excretadas rápidamente sin producir efectos significativos en el organismo.¹² Los arsenoazúcares, con más de 15 formas moleculares diferentes conocidas, se encuentran en elevadas concentraciones en algas marinas, moluscos y gasterópodos, siendo sus efectos sobre la salud tema de debate para la comunidad científica.^{13,14} Por su parte, los compuestos metilados de arsénico han sido considerados hasta hace pocos años como no tóxicos; sin embargo, estudios recientes indican que las especies metiladas de arsénico trivalente podrían ser incluso más tóxicas que las formas inorgánicas.^{2,4,7} Las especies predominantes de arsénico en las aguas son el As(III) y As(V), presentando el As(III) mayor solubilidad y movilidad, lo que justifica su mayor toxicidad. En medios oxidantes el As(V) se encuentra en mayor proporción, pasando de la forma H_2AsO_4^- a HAsO_4^{2-} al aumentar el pH por encima de 6.9. Por el contrario, bajo condiciones ligeramente reductoras el As(III) es la especie predominante, encontrándose en la forma $\text{As}(\text{OH})_3$ hasta pH 9.2. Sin embargo, la proporción relativa de estos estados de oxidación no sólo depende de las condiciones

físico-químicas del medio como el potencial redox (E_h) y el pH. La acción microbiana juega también un papel clave, ya que algunos procesos biológicos involucrados en el metabolismo de estos microorganismos promueven la reducción del As(V) y la oxidación del As(III), además de la metilación a ácido monometilarsónico (MMA), ácido dimetilarsónico (DMA) y óxido de trimetilarsina (TMAO).^{1,15}

Como consecuencia de la diferente toxicidad de las especies de arsénico se hace imprescindible determinar cada una de ellas individualmente, siendo insuficiente el conocimiento del elemento total presente en la muestra. Para ello, se suele utilizar una técnica de separación, tal como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), la cromatografía de gases (GC) y la electroforesis capilar (CE), junto con un detector específico del elemento: espectrofotometría de fluorescencia atómica (AFS), espectrofotometría de absorción atómica de llama (FAAS) o electrotérmica (ETAAS), espectrofotometría de emisión atómica con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-AES) y espectrometría de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS).^{16,17} De entre todas las combinaciones, el acoplamiento HPLC-ICP-MS se sitúa como una de las mejores opciones para llevar a cabo la especiación de As.¹⁸ La versatilidad del HPLC, que ofrece diversos mecanismos de separación, permite que se pueda aplicar a una gran variedad de compuestos de importancia medioambiental. Por otro lado, el ICP-MS es actualmente el detector elemental más sensible y robusto disponible comercialmente, ofreciendo varias ventajas en comparación con los detectores tradicionales, entre las que cabe destacar su amplio rango de linealidad y capacidad multielemental. Gracias a esta última, es posible determinar simultáneamente especies de elementos como el selenio, que al parecer contrarrestan algunos de los efectos tóxicos del arsénico.¹⁹

El selenio es un elemento traza esencial y entre sus funciones están las de protección de la membrana celular o la interacción con metales pesados tóxicos.²⁰ El intervalo de concentración adecuado (entre deficiencia y toxicidad) es verdaderamente estrecho y depende de su forma química.²¹⁻²³ Aunque el selenio es poco abundante en la corteza terrestre (0.05 mg kg^{-1}), sus compuestos son masivamente liberados al medio a causa de la utilización de combustibles fósiles, vertidos ilegales procedentes de la minería, la industria electrónica y del vidrio, así

como la agricultura. Su movilidad, biodisponibilidad y toxicidad depende de su estado de oxidación, lo que hace necesaria su especiación. Las formas predominantes de selenio en las aguas son el selenito (Se(IV)) y selenato (Se(VI)).²⁴ Se ha observado que los compuestos orgánicos de selenio son unas 500 veces menos tóxicos que el Se(IV), que a su vez está considerado más peligroso para los organismos acuáticos que el Se(VI) debido a su alta solubilidad y biodisponibilidad.²⁰ Por consiguiente, la especiación de Se inorgánico en aguas medioambientales es de gran importancia desde el punto de vista clínico y medioambiental.

En este capítulo se exploran las mejoras que puede conllevar la utilización de un sistema de cromatografía líquida de bajo flujo (microHPLC) acoplado a un ICP-MS para la especiación de arsénico y selenio en aguas medioambientales. En primer lugar se lleva a cabo la adaptación de un método de especiación multielemental desarrollado para flujos convencionales a microflujos. La miniaturización de la separación consiste básicamente en la utilización de un sistema de cromatografía capilar, una columna microbore y un micronebulizador, que permite introducir más eficientemente el bajo caudal de analito procedente de la columna. Para conseguir determinar los diferentes compuestos en estas nuevas condiciones, no sólo resulta indispensable realizar una minuciosa optimización de los parámetros instrumentales, sino que es necesario abordar algunos problemas adicionales derivados del sistema microHPLC. En el **artículo científico 1** se ha realizado un estudio pormenorizado de las interacciones secundarias aparecidas al utilizar microHPLC-ICP-MS en la modalidad de intercambio aniónico. Por un lado, se ha caracterizado la naturaleza de las retenciones adicionales al mecanismo de separación principal, justificando en qué condiciones y en qué magnitud se ven afectados los compuestos determinados y proponiendo un mecanismo de interacción para dicho proceso. Posteriormente, se han planteado y evaluado diferentes estrategias para hacer compatible la determinación de los compuestos monitorizados con el uso de bajos caudales de fase móvil. Una vez solventado el problema de las interacciones secundarias, se han llevado a cabo una serie de modificaciones en el método cromatográfico preliminar para explotar al máximo el potencial de la columna microbore utilizada. En este sentido, la reducción del volumen extracolumna es clave de cara a no comprometer

la mejora en la eficiencia de la separación proporcionada por este tipo de columnas, por lo que se realizó una minimización exhaustiva de las dimensiones de todos los capilares por los que es conducida la muestra hacia el detector. Además, se ha evaluado el uso de fases móviles mixtas para evitar la cola con la que eluyen algunos de los compuestos seleccionados. Todo ello hace posible valorar adecuadamente las prestaciones reales de las columnas microbore y aclarar las contradicciones existentes en la bibliografía acerca del efecto de la disminución del diámetro interno de las columnas cromatográficas. La metodología se ha validado para aguas medioambientales, e incluye una ecuación de corrección matemática para corregir el solapamiento del pico de MMA con la interferencia poliatómica $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$ originada en muestras con alto contenido salino. Los resultados de este trabajo se detallan en el **artículo científico 2**. El método de especiación de As y Se desarrollado se aplicó posteriormente a diferentes aguas de pozos de riego y abastecimiento urbano localizadas en el acuífero de la Plana de Castellón, lo que permitió presentar los primeros datos sobre los niveles de As(III), As(V), DMA, MMA, Se(IV) y Se(VI) en estos enclaves.

Por otro lado, se ha hecho uso del acoplamiento microHPLC-ICP-MS para determinar As(III) y As(V) en drenajes ácidos de mina. Puesto que este tipo de aguas están caracterizadas por poseer un pH muy bajo, se ha propuesto un método de separación en medio ácido para evitar la posible interconversión de especies así como la precipitación de los numerosos compuestos metálicos que contienen. En estas condiciones, las interacciones de los analitos con la fase estacionaria de intercambio aniónico se ven modificadas, por lo que es necesario evaluar el comportamiento de fases móviles alternativas que permitan la correcta elución de estos dos compuestos. La metodología propuesta, una vez validada, ha sido utilizada en un proyecto de investigación del Instituto de Ciencias de la Tierra "Jaume Almera" (CSIC) con el fin de determinar la proporción relativa de las especies inorgánicas de arsénico en diferentes muestras procedentes de la mina abandonada de Tinto-Santa Rosa (Huelva).

Finalmente, se ha desarrollado un método de especiación de arsénico para muestras de orina que hace uso de un patrón interno de germanio para corregir los efectos matriz y de deriva de la señal derivados de la matriz de la muestra. En el ICP-

MS los compuestos son convertidos en sus elementos constituyentes, de forma que la señal depende exclusivamente del heteroátomo monitorizado, independientemente del compuesto de partida. Basándonos en este principio y teniendo en cuenta el amplio rango de linealidad del detector, es posible realizar una calibración de un solo punto aplicable a las diferentes especies de As seleccionadas, consistente en la adición post-columna de una disolución patrón de As. Si a esta disolución se le introduce un patrón interno con características físico-químicas similares, como el Ge, ambos elementos responderán a las variaciones instrumentales de manera análoga. En consecuencia, la adición continua post-columna de As y Ge puede proporcionar la concentración corregida de los compuestos de As separados en una sola inyección de muestra. En este trabajo, se ha efectuado la separación de AsB, As(III), DMA, MMA y As(V) con un sistema HPLC convencional, utilizando un microHPLC para introducir la disolución de patrón interno sin diluir excesivamente las especies de analito. El procedimiento ha sido aplicado a muestras de orina y se ha comparado con el método de las adiciones estándar y calibración interna. Los resultados se recogen en el **artículo científico 3**.

Bibliografía

1. Lièvremon, D.; Bertin, P.N.; Lett, M.-C. *Arsenic in contaminated waters: Biogeochemical cycle, microbial metabolism and biotreatment process*. *Biochimie* **2009**, 91, 1229-1237.
2. Ralph, S.J. *Arsenic-based antineoplastic drugs and their mechanisms of action*, *Met. Based Drugs* **2008**, 2008, 260146.
3. Léonard, A. *Metals and metalloids, and their ions and compounds*. In: Merian, E. (Ed.), *Metals and their compounds in the environment*. VCH, Weinheim, **1991**; pp. 751-774.
4. Villaescusa, I.; Bollinger, J.-C. *Arsenic in drinking water: sources, occurrence and health effects (a review)*. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* **2008**, 7, 307-323.
5. Vassileva, E.; Becker, A.; Broekaert, J.A.C. *Determination of arsenic and selenium species in groundwater and soil extracts by ion chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry*. *Anal. Chim. Acta* **2001**, 441, 135-146.
6. Sarmiento, A.M.; Oliveira, V.; Gómez-Ariza, J.L.; Nieto, J.M.; Sánchez-Rodas, D. *Diel cycles of arsenic speciation due to photooxidation in acid mine drainage from the Iberian Pyrite Belt (SW Spain)* *Chemosphere* **2007**, 66, 677-683.
7. Sharma, V.K.; Shon, M. *Aquatic arsenic: Toxicity, speciation, transformations, and remediation*. *Environ. Int.* **2009**, 35, 743-759.
8. Ellwood, M.J.; Maher, W.A. *Measurement of arsenic species in marine sediments by high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry*. *Anal. Chim. Acta* **2003**, 477, 279-291.
9. Mandal, B.K.; Suzuki, K.T. *Arsenic round the world: A review*. *Talanta* **2002**, 58, 201-235.
10. Neff, J.M. *Ecotoxicology of arsenic in the marine environment*. *Environ. Toxicol. Chem.* **1997**, 16, 917-927.

11. Caroli, S.; la Torre, F.; Petrucci, F.; Violante, N. *Arsenic speciation and health aspects*. In: Caroli S. (Ed.), *Element Speciation in Bioinorganic Chemistry*, Wiley, **1996**; pp. 445-464.
12. Verdon, C.P.; Caldwell, K.L.; M. Fresquez, M.R.; Jones, R.L. *Determination of seven arsenic compounds in urine by HPLC-ICP-DRC-MS: a CDC population biomonitoring method*. *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, 393, 939-947.
13. Fieldmann, J.; Krupp, E.M. *Critical reviews or scientific opinion paper: Arsenosugars—a class of benign arsenic species or justification for developing partly speciated arsenic fractionation in foodstuffs?* *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, 399, 1735-1741.
14. Niegel, C.; Matysik, F.-M. *Analytical methods for the determination of arsenosugars—A review of recent trends and developments*. *Anal. Chim. Acta* **2010**, 657, 83-99.
15. Fodor, P. *Arsenic speciation in the environment*. In: Ebdon, L.; Pitts, L., Cornelis, R.; Crews, H.; Donard, O.F.X.; Quevauviller, Ph. (Eds.), *Trace Element Speciation for Environment, Food and Health*. Royal Society of Chemistry, Cambridge, **2001**; pp. 196-210.
16. Terlecka, E. *Arsenic speciation analysis in water samples: A review of the hyphenated techniques*. *Environ. Monit. Assess.* **2005**, 107, 259-284.
17. B'Hymer, C.; Caruso, J.A. *Arsenic and its speciation using high-performance chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry*. *J. Chromatogr. A* **2004**, 1045, 1-13.
18. Ali, I.; Jain, C.K. *Advances in arsenic speciation techniques*. *Intern. J. Environm. Anal. Chem.* **2004**, 84, 947-964.
19. Pan, F.; Tyson, J.F.; Uden, P.C. *Simultaneous speciation of arsenic and selenium in human urine by high-performance liquid chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry*. *J. Anal. At. Spectrom.* **2007**, 22, 931-937.
20. Gómez-Ariza, J.L.; Pozas, J.A.; Giráldez, I.; Morales, E. *Speciation of volatile forms of selenium and inorganic selenium in sediments by gas chromatography-mass spectrometry* *J. Chromatogr. A* **1998**, 823, 259-277.

21. Ochsenkühn-Petropoulou, M.; Michalke, B.; Kavouras, D.; Schramel, P. *Selenium speciation analysis in a sediment using strong anion exchange and reversed phase chromatography coupled with inductively coupled plasma-mass spectrometry*. *Anal. Chim. Acta* **2003**, 478, 219-227.
22. Zheng, J.; Ohata, M.; Furuta, N. *Reversed-phase liquid chromatography with mixed ion-pair reagents coupled with ICP-MS for the direct speciation analysis of selenium compounds in human urine*. *J. Anal. At. Spectrom.* **2002**, 17, 730-735
23. Gómez-Ariza, J.L.; Sánchez-Rodas, D.; Caro de la Torre, M.A.; Giráldez, I.; Morales, E. *Column-switching system for selenium speciation by coupling reversed-phase and ion-exchange high-performance liquid chromatography with microwave-assisted digestion-hydride generation atomic fluorescence spectrometry*. *J. Chromatogr. A* **2000**, 889 33-39.
24. Chand, V.; Prasad, S. *Trace determination and chemical speciation of selenium in environmental water samples using catalytic kinetic spectrophotometric method*. *J. Hazard. Mater.* **2009**, 165, 780-788.

2.2. INTERACCIONES ADICIONALES DE LOS GRUPOS –OH DE LAS ESPECIES DE As y Se CON LOS CAPILARES DE SÍLICE FUNDIDA EN MICRO-CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE INTERCAMBIO ANIÓNICO

Entre las principales ventajas del acoplamiento HPLC-ICP-MS cabe destacar que ofrece una gran versatilidad de separación, no precisa derivatización previa, proporciona límites de detección extremadamente bajos y posee capacidad multielemental.^{1,2} Esto lo convierte en la opción ideal para llevar a cabo la especiación conjunta de As y Se.³⁻⁵ Sin embargo, debido a la naturaleza del detector, este acoplamiento presenta una serie de inconvenientes y limitaciones. Así por ejemplo, el uso de fases móviles basadas en fosfatos de sodio o potasio no resulta apropiado, debido a que se depositan sales en las lentes y en los conos que provocan una lenta deriva de la señal. Por otro lado, la adición de disolventes orgánicos, requeridos en numerosas separaciones cromatográficas, ocasiona inestabilidad en el plasma y una considerable disminución de la sensibilidad.⁶ Es por ello que se ha propuesto la utilización de bajos caudales de líquido y microcolumnas como alternativa a los sistemas convencionales.^{7,8} En efecto, el acoplamiento microHPLC-ICP-MS podría reducir los efectos perjudiciales asociados a la introducción de elevadas cantidades de disolventes y sales en el plasma, minimizando tanto el consumo de fases móviles como de muestra y proporcionando mejores eficiencias de separación.⁹

De acuerdo con todas estas ventajas, se adaptó un método de determinación de As(III), As(V), DMA, MMA, Se(IV), Se(VI) y Cr(VI) previamente desarrollado para flujos convencionales a microflujos.¹⁰ Para este fin, se hizo uso del nebulizador de bajo flujo Micromist, una columna de intercambio iónico microbore (150 x 1 mm, 3 μ m) y un sistema cromatográfico capilar, el cual permite bombear la fase móvil a pocos μ L min⁻¹ de manera reproducible y exacta con un mínimo volumen muerto. Todas estas modificaciones debían suponer una mejora significativa en las características analíticas del método, pero en cambio se observaron interacciones secundarias relevantes. Concretamente, al bombear una fase móvil consistente en NH₄NO₃ a pH 8.7 el MMA eluyó con un ensanchamiento de pico severo, mientras que para el As(III),

As(V) y Se(IV) ni tan si quiera se obtuvo pico, sólo un pequeño incremento de la línea base. Por el contrario, al conectar la microcolumna al sistema convencional no se advirtió este comportamiento anómalo. Consecuentemente, la fuente del problema debía de estar relacionada con el sistema microHPLC utilizado, de manera que se realizó una caracterización exhaustiva del mismo. Los resultados mostraron que los ensanchamientos de pico se debían a una interacción del tipo enlace de hidrógeno, adicional al mecanismo de intercambio aniónico principal. La sílice fundida de los capilares con los que viene equipado el microHPLC se hidroliza a $\text{pH} > 8.5$. Con ello se desprenden pequeños fragmentos de sus paredes que contienen grupos silanol que son arrastrados hasta la columna analítica, donde interaccionan con la resina de intercambio iónico.¹¹ Una vez en la columna, estos productos de degradación interaccionan con los analitos que contienen grupos hidroxilo ($-\text{OH}$); a $\text{pH} 8.7$: As(III), As(V), Se(IV) y MMA. Este punto fue confirmado llevando a cabo dos experimentos. El primero de ellos consistió en ajustar el pH de la fase móvil a 10 e inyectar a continuación un patrón de MMA. De acuerdo con el mecanismo propuesto, el compuesto eluyó correctamente, dado que al ser el pH utilizado mucho mayor que sus pK_{as} ($\text{pK}_{\text{a1}} = 3.6$ y $\text{pK}_{\text{a2}} = 8.2$) no contenía ningún $-\text{OH}$ susceptible de interaccionar con los grupos silanol. En segundo lugar, se evaluó el efecto de una sal con grupos $-\text{OH}$ en la fase móvil. Al bombear $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ a $\text{pH} 8.7$, no se observaron interacciones adicionales para ninguna de las especies. Como cabía esperar, los grupos $-\text{OH}$ del hidrogenofosfato compiten con los de los analitos, enmascarando el efecto de los productos de degradación de la sílice retenidos en la columna.

Una vez descrita la naturaleza de los ensanchamientos de pico observados al utilizar el acoplamiento microHPLC-ICP-MS, se evaluaron diferentes estrategias para resolver el problema. Así, se comprobó que la sustitución de los capilares de PFS por PEEK, la disminución del pH por debajo de 8.5 o la adición a la fase móvil de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, permite la correcta elución de todas las especies. En particular, la última de las opciones resultó ser una vía interesante para mejorar la forma de pico de muchos de los analitos estudiados, por lo que en el siguiente trabajo se hizo uso de una fase móvil mixta de NH_4NO_3 y $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$.

2.2.1. Bibliografía

1. Terlecka, E. *Arsenic speciation analysis in water samples: A review of the hyphenated techniques*. Environ. Monit. Assess. **2005**, 107, 259-284.
2. B'Hymer, C.; Caruso, J.A. *Arsenic and its speciation using high-performance chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry*. J. Chromatogr. A **2004**, 1045, 1-13.
3. Tonietto, G.B.; Godoy, J.M.; Oliveira, A.C.; Souza, M.V. *Simultaneous speciation of arsenic (As(III), MMA, DMA, and As(V)) and selenium (Se(IV), Se(VI), and SeCN-) in petroleum refinery aqueous streams*. Anal. Bioanal. Chem. **2010**, 397, 1755-1761.
4. Pan, F.; Tyson, J.F.; Uden, P.C. *Simultaneous speciation of arsenic and selenium in human urine by high-performance liquid chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry*. J. Anal. At. Spectrom. **2007**, 22, 931-937.
5. Wangn, R.Y.; Hsu, Y.L.; Chang, L.F.; Jiang, S.J. *Speciation analysis of arsenic and selenium compounds in environmental and biological samples by ion chromatography-inductively coupled plasma dynamic reaction cell mass spectrometer*. Anal. Chim. Acta **2007**, 590, 239-244.
6. B'Hymer, C.; Caruso, J.A. *Selenium speciation analysis using inductively coupled plasma-mass spectrometry*. J. Chromatogr. A **2006**, 1114, 1-20.
7. Todoli, J.L.; Mermet, J.M. *Elemental analysis of liquid microsamples through inductively coupled plasma spectrochemistry*. Trends Anal. Chem. **2005**, 24, 107-116.
8. Ackley, K.L.; Sutton, K.L.; Caruso, J.A. *A comparison of nebulizers for microbore LC-ICP-MS with mobile phases containing methanol*. J. Anal. At. Spectrom. **2000**, 15, 1069-1073.
9. Jerkovich, A.D.; Mellors, J.S.; Jorgenson, J.W. *Recent developments in LC column technology*. LC-GC Eur. **2003**, 16, 20-23.
10. Roig-Navarro, A.F.; Martínez-Bravo, Y.; López, F.J.; Hernández, F. *Multielemental determination of arsenic, selenium and chromium(VI) species in water by high-*

performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry. J. Chromatogr. A **2001**, 926, 265-274.

11. El Tayar, N.; Tsantili-Kakoulidou, A.; Roethlisberger, T.; Testa, B.; Gal, J. *Different partitioning behaviour of sulphonyl-containing compounds in reversed-phase high-performance liquid chromatography and octanol-water systems*. J. Chromatogr. **1998**, 439, 237-244.

2.2.2. Artículo científico 1

"Secondary interactions, an unexpected problem emerged between hydroxyl containing analytes and fused silica capillaries in anion-exchange micro-liquid chromatography"

A. Castillo, A.F. Roig-Navarro and O.J. Pozo.

Journal of Chromatography A, 1172 (2007) 179–185.



Available online at www.sciencedirect.com



Journal of Chromatography A, 1172 (2007) 179–185

JOURNAL OF
CHROMATOGRAPHY A

www.elsevier.com/locate/chroma

Secondary interactions, an unexpected problem emerged between hydroxyl containing analytes and fused silica capillaries in anion-exchange micro-liquid chromatography

A. Castillo, A.F. Roig-Navarro*, O.J. Pozo

Research Institute for Pesticides and Water, Universitat Jaume I, E-12071 Castelló, Spain

Received 13 July 2007; received in revised form 27 September 2007; accepted 5 October 2007
Available online 10 October 2007

Abstract

Relevant secondary interactions (hydrogen-bond type), additional to the main anion-exchange mechanism, were found when a method for As, Se and Cr speciation was developed based on microLC-inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) coupling. In order to get the claimed analytical performance characteristics of the microbore columns, microLC systems are equipped with very narrow bore fused silica capillaries. When a mobile phase of NH_4NO_3 at pH 8.7 was used, a notable tailing was observed for As(III), As(V), MMA and Se(IV), species containing hydroxyl groups in its chemical structure at this pH value. However, additional interactions appeared neither when the fused silica capillaries of the capillary LC system were substituted for polyetheretherketone (PEEK) nor operating at pH below 8.5. A mechanism to explain the additional interaction observed is proposed and tested in this work. It seems that high pH values produce a partial hydrolysis of the siloxane groups of the fused silica capillaries. Under these conditions, degradation products of silica, containing ionized silanol groups, reach the column and interact with the anion-exchange resin. Then, ionized silanol groups, retained on the column, can interact with the hydroxyl moiety of the aforementioned analytes leading to severe peak tailing and broadening. Different strategies were evaluated to solve the problem. The addition of a salt containing hydroxyl groups in the mobile phase such as hydrogen phosphate, the diminution of the pH and the use of PEEK capillaries in the microHPLC system demonstrated to be suitable. Finally, two alternative microHPLC-ICP-MS separations, based on a gradient elution of NH_4NO_3 at pH 8.0 and $\text{NH}_4\text{NO}_3/\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ at pH 8.7, were optimized and compared. Results showed better peak shapes for some species when hydrogen phosphate was added to the mobile phase.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Secondary interactions; Fused silica capillaries; Hydroxyl containing analytes; Anion-exchange chromatography; Micro-liquid chromatography; Dipole-ion interaction; Basic hydrolysis of silica

1. Introduction

The need for speciation analysis is widely recognized nowadays [1]. Trace arsenic and selenium speciation is normally performed by HPLC-ICP-MS coupling, since LC provides a wide range of separation mechanisms and no derivatization steps are required [2–5]. Also, multielemental capability of ICP-MS can be exploited [6–9]. This coupling, although regarded as straightforward, has several problems due to the large amounts of solvents and salts than, finally, can reach the plasma. The use of low liquid flow rates in conjunction with microbore columns

seems to be one of the best choices to solve the detrimental effects associated to the introduction of high amounts of solvent into the plasma [10]. However, special care must be taken into account with the dead volume and the robustness of the system [11]. Furthermore, micronebulizers must be used since classical nebulizers suffer from low analyte transport efficiencies [12]. The expectable main features of the coupling microHPLC-ICP-MS can be summarized as it follows:

- Low sample consumption, a paramount characteristic in sample limited cases [11], and less solvent use. However, solvent consumption depends on the pump operation and, in fact, most pumping systems work with a primary flow rate in the range of 0.2–1.0 mL/min [13].

* Corresponding author. Tel.: +34 964 387359; fax: +34 964 387368.
E-mail address: roig@qfai.uji.es (A.F. Roig-Navarro).

JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A

J. Chromatogr. A, 1172 (2007) 179–185

Received: 13 July 2007; Accepted: 5 October 2007; Published online: 10 October 2007 in ScienceDirect
(www.sciencedirect.com) DOI: 10.1016/j.chroma.2007.10.007

Secondary interactions, an unexpected problem emerged between hydroxyl containing analytes and fused silica capillaries in anion-exchange micro-liquid chromatography

A. Castillo, A.F. Roig-Navarro, O.J. Pozo

Research Institute for Pesticides and Water, Universitat Jaume I, E-12071 Castelló, Spain

ABSTRACT

Relevant secondary interactions (hydrogen-bond type), additional to the main anion-exchange mechanism, were found when a method for As, Se and Cr speciation was developed based on microLC-inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) coupling. In order to get the claimed analytical performance characteristics of the microbore columns, microLC systems are equipped with very narrow bore fused silica capillaries. When a mobile phase of NH_4NO_3 at pH 8.7 was used, a notable tailing was observed for As(III), As(V), MMA and Se(IV), species containing hydroxyl groups in its chemical structure at this pH value. However, additional interactions appeared neither when the fused silica capillaries of the capillary LC system were substituted for polyetheretherketone (PEEK) nor operating at pH below 8.5. A mechanism to explain the additional interaction observed is proposed and tested in this work. It seems that high pH values produce a partial hydrolysis of the siloxane groups of the fused silica capillaries. Under these conditions, degradation products of silica, containing ionized silanol groups, reach the column and interact with the anion-exchange resin. Then, ionized silanol groups, retained on the column, can interact with the hydroxyl moiety of the aforementioned analytes leading to severe peak tailing and broadening. Different strategies were evaluated to solve the problem. The addition of a salt containing hydroxyl groups in the mobile phase such as hydrogen phosphate, the diminution of the pH and the use of PEEK capillaries in the microHPLC system demonstrated to be suitable. Finally, two alternative microHPLC–ICP-MS separations, based on a gradient elution of NH_4NO_3 at pH 8.0 and $\text{NH}_4\text{NO}_3/\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ at pH 8.7, were optimized and compared. Results showed better peak shapes for some species when hydrogen phosphate was added to the mobile phase.

KEYWORDS

Secondary interactions; Fused silica capillaries; Hydroxyl containing analytes; Anion-exchange chromatography; Micro-liquid chromatography; Dipoleion interaction; Basic hydrolysis of silica

1. INTRODUCTION

The need for speciation analysis is widely recognized nowadays [1]. Trace arsenic and selenium speciation is normally performed by HPLC–ICP–MS coupling, since LC provides a wide range of separation mechanisms and no derivatization steps are required [2–5]. Also, multielemental capability of ICP–MS can be exploited [6–9]. This coupling, although regarded as straightforward, has several problems due to the large amounts of solvents and salts than, finally, can reach the plasma. The use of low liquid flow rates in conjunction with microbore columns seems to be one of the best choices to solve the detrimental effects associated to the introduction of high amounts of solvent into the plasma [10]. However, special care must be taken into account with the dead volume and the robustness of the system [11]. Furthermore, micronebulizers must be used since classical nebulizers suffer from low analyte transport efficiencies [12]. The expectable main features of the coupling microHPLC–ICPMS can be summarized as it follows:

- Low sample consumption, a paramount characteristic in sample limited cases [11], and less solvent use. However, solvent consumption depends on the pump operation and, in fact, most pumping systems work with a primary flow rate in the range of 0.2–1.0 mL/min [13].
- Two principal advantages claimed are the increment of the relative peak concentration on the column and the lower introduction of solvent into the plasma. Detrimental effects of mobile phases reaching the plasma are mainly related with the organic content [10,14] which can cause degradation of the signal over time. Micronebulizers generate a finer, more homogeneous aerosol, with high rate of solvent evaporation, which can be partially removed with cooled spray chambers [10]. The use of microbore columns, with lower internal diameter and packed with smaller size particles, diminishes both the transversal and axial diffusion. Thus, narrower and higher peaks can be obtained [11] and, consequently, greater resolving power and lower detection limits can be expected. Testing these features seems to be interesting in order to improve the analytical methodology applied using conventional HPLC systems.

On the other hand, to reach full capabilities of microbore columns, LC systems with reduced dead volume and optimized flow geometries of all connection capillaries are required. However,

neither stainless steel nor plastic are suitable materials to build such very narrow connection. The best choice seems to be the use of PEEK coated fused silica (PFS) capillaries, because of their robustness and very low tendency to plugging [13]. The capillary LC Agilent 1100 Series used in the present work is equipped with PFS capillaries. Although fused silica is considered like inert material, it presents the limitations of pH [15] and can be partially dissolved under basic conditions needed for a given separation. This work shows the occurrence of relevant additional interaction between As, Se and Cr species and the degradation products of fused silica inside an anion-exchange microbore column. Those products of degraded silica, with dissociated silanols, provoke severe peak tailing of hydroxyl groups ($-OH$) containing species. In order to characterize and solve the problem, changes in connection capillaries, pH and mobile phase composition were assessed.

2. EXPERIMENTAL

2.1. Instrumentation

The microHPLC system consisted of an Agilent 1100 Series (Agilent, Waldbronn, Germany) binary pump, and auto injector with a programmable sample loop (20 μL maximum). The selected injection volume was 5 μL . The separations were performed at 50 $\mu L \text{ min}^{-1}$, on a PRP-X100 (Hamilton, Reno, NV, USA) anion-exchange column (150 mm \times 1 mm, 3 μm).

The microbore column was connected via 30 cm of PEEK capillary tubing (0.125 mm i.d.) to a Micro Mist nebulizer. A Hewlett-Packard 4500 ICP-MS (Yokogawa Analytical Systems, Tokyo, Japan) was used in this work. For microHPLC–ICP-MS data acquisition the “time resolved analysis” mode was used with 0.3 s of integration time per mass. Measurement masses selected were: m/z 53 for chromium, 75 for arsenic and 77 for selenium.

For tuning of ICP-MS, a solution containing 10 $\mu g \text{ L}^{-1}$ of As, Se and Cr made up in double deionized water filtered through 0.22 μm was monitored and the ion intensity was optimized. Then, resolution and mass axis were also optimized.

2.2. Standards and reagents

$NaAsO_2$ (analytical reagent, a.r.), $Na_2HAsO_4 \cdot 7H_2O$ (a.r.), $Na(CH_3)_2AsO_2 \cdot 3H_2O$ (Biochemika), $Na_2SeO_3 \cdot 5H_2O$ (Chemika) and Na_2SeO_4 (Chemika) were from Fluka (Buchs, Switzerland), $Na_2CH_3AsO_3 \cdot 6H_2O$ (a.r.) was delivered by Carlo Erba (Milano, Italy), and K_2CrO_4 (a.r.) was purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Stock solutions of arsenic, selenium and chromium compounds containing about 1000 $mg \text{ L}^{-1}$ As, Se and Cr were prepared in water and

maintained at 4 °C. Appropriate dilutions of the stock solution were prepared daily, by weight, using double deionized water to obtain the required concentration.

The mobile phases used ammonium nitrate buffers prepared from NH_4NO_3 (p.a., Scharlau, Barcelona, Spain) and phosphate buffers from $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (a.r., Merk). The pH value was adjusted by the addition of NH_3 (Trace Select, Fluka). These solutions were filtered through a 0.22 μm membrane before use.

All the aqueous solutions were prepared with Milli Q Gradient A10 (Millipore, Molsheim, France) water (18.2 $\text{M}\Omega\text{ cm}$).

3. RESULTS AND DISCUSSION

The simultaneous separation of As(III), As(V), DMA, MMA, Se(IV), Se(VI) and Cr(VI) using microHPLC–ICP–MS was based on a previous work using an anion-exchange polymeric column and conventional flows [7]. To this aim, flow rate and injection volume were properly adjusted to the microbore column dimensions [16]. The chromatographic conditions are summarized in Table 1.

When the microHPLC system was used to separate the selected species remarkable non-expected problems were encountered for some of them. Namely, MMA eluted with extreme tailing and no peaks were obtained for As(III), As(V) and Se(IV) species (Fig. 1). It can be pointed out a slight baseline increment for the last three species. This behavior was attributed to some interactions additional to the anionic-exchange mechanism of the column, producing notable peak broadening. However, DMA, Cr(VI) and Se(VI) (not shown in Fig. 1) were not affected by this additional mechanism and eluted from the column with a normal chromatographic peak, similarly to those reported using conventional flows [7]. Therefore, this anomalous behavior should arise from As(III), As(V), Se(IV) and MMA species as well as the use of microHPLC–ICP–MS.

In order to characterize and solve this problem several strategies were carried out, as shown below.

Table 1. Different operational conditions and gradient programs assayed

Gradient program 1			Gradient program 2			Gradient program 3		
Time (min)	%A	%B	Time (min)	%A	%B	Time (min)	%A	%B
0	100	0	0	100	0	0	100	0
1	100	0	5	100	0	4	100	0
1.5	50	50	5.5	50	50	4.5	50	50
3	50	50	7	50	50	6	50	50
3.5	0	100	7.5	0	100	6.5	0	100
10	0	100	10	0	100	10	0	100
10.5	100	0	10.5	100	0	10.5	100	0
14	100	0	14	100	0	14	100	0
A: 20 mM NH_4NO_3 , pH 8.7			A: 10 mM NH_4NO_3 , pH 8.0			A: 5 mM NH_4NO_3 + 1 mM $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ pH 8.7		
B: 60 mM NH_4NO_3 , pH 8.7			B: 80 mM NH_4NO_3 , pH 8.0			B: 70 mM NH_4NO_3 + 5 mM $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ pH 8.7		
PFS or PEEK Capillaries			PFS Capillaries			PFS Capillaries		

3.1. Characterization of the additional interaction using microHPLC–ICP–MS

As described above, As(III), As(V), Se(IV) and MMA showed severe peak broadening among all the species injected through the microLC system. Taking into account the main retention mechanism – anion-exchange – and that all species are anions (with the exception of As(III), eluted near the dead volume), the additional interaction should be related with specific differences in its chemical structure. For this reason, the predominant chemical forms of each species under the eluent pH [17–19] were examined. As can be seen in Fig. 2, only As(III), As(V), Se(IV) and MMA maintain hydroxyl groups at pH 8.7. However, DMA, Se(VI) and Cr(VI), which eluted with a suitable chromatographic peak, only contain ionized (deprotonated) hydroxyl groups. Furthermore, in the case of MMA, a species containing hydroxyl groups, the chemical form maintaining –OH is not predominant according to the pH and pK_a values. This is in good agreement with the chromatographic behavior found (Fig. 1), since lower peak broadening was obtained for MMA than for the rest of species suffering additional interaction: As(III), As(V) and Se(IV). Thus, the chromatographic problem seemed to be related with the presence of hydroxyl groups in the analytes.

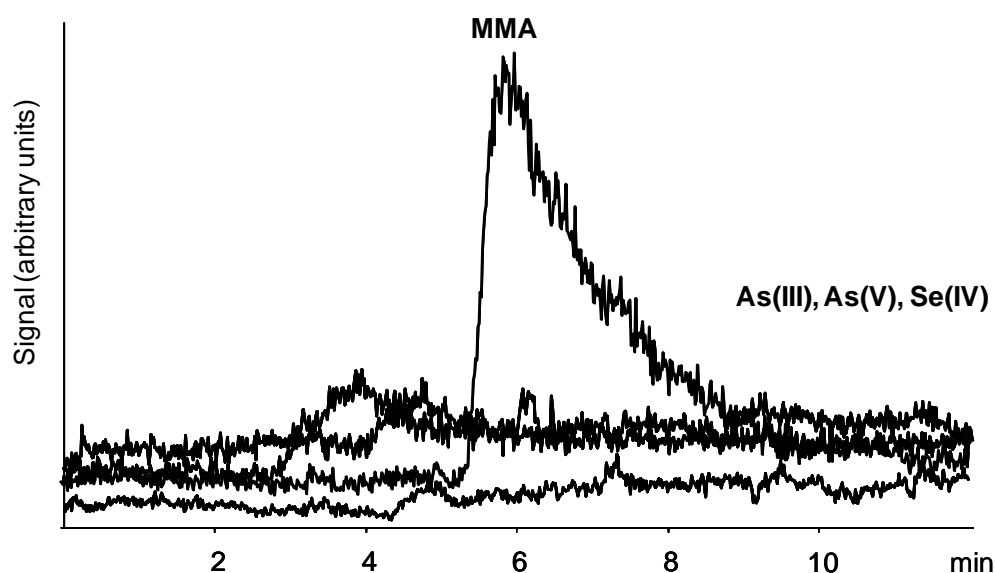


Figure 1. Anion exchange chromatogram observed after the injection of some arsenic and selenium species using microHPLC–ICPMS. Only a slight baseline increment was noticed for As(III), As(V) and Se(IV) species, and MMA eluted with extreme tailing.

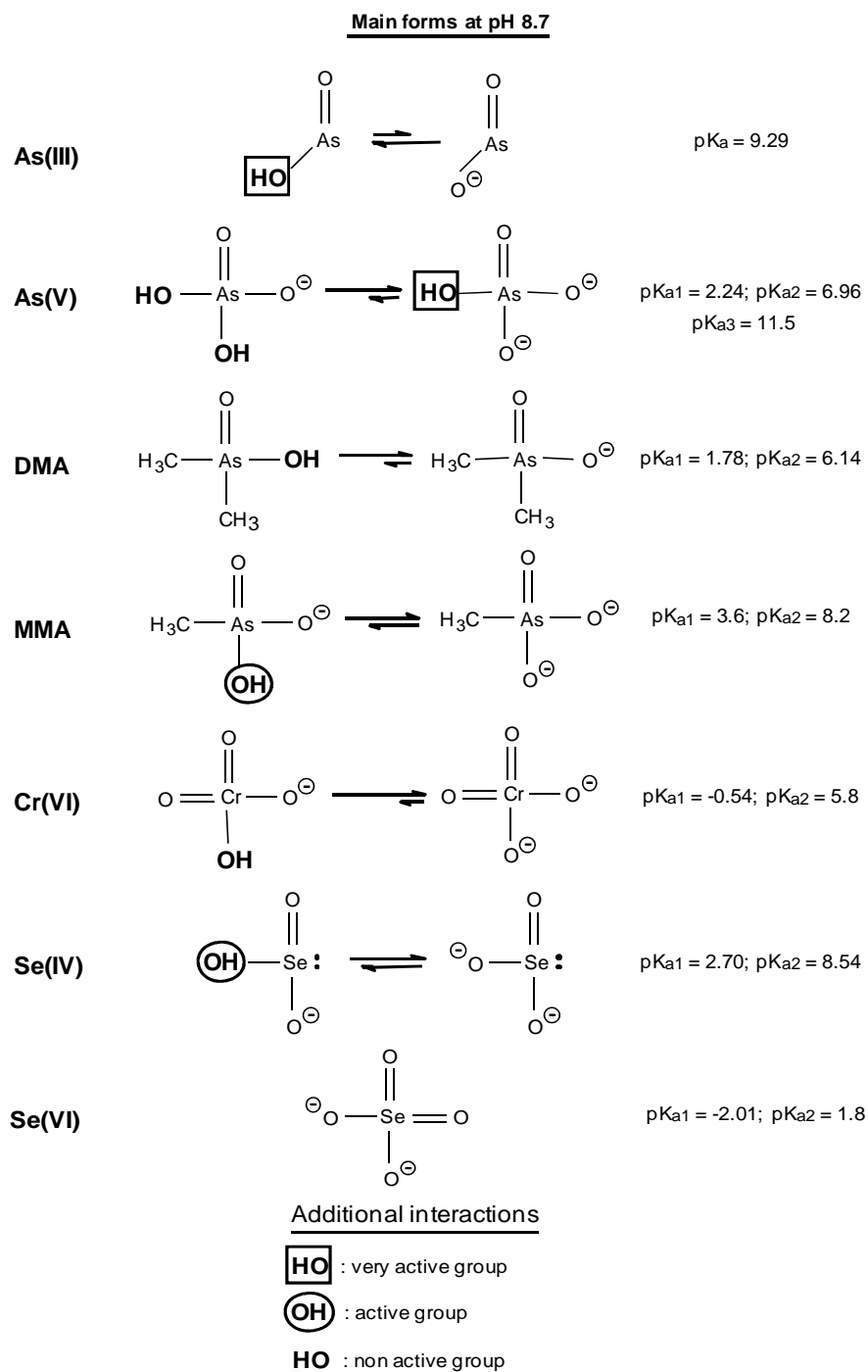


Figure 2. Main molecular forms of each species at pH 8.7 according to pK_a values. Active -OH groups are emphasized. Length of arrows indicate the predominant form in these conditions.

To confirm this hypothesis, two experiments were carried out. In the first trial, the pH of the eluent was raised and adjusted to 10 and a MMA standard was injected. As expected, this compound eluted with a satisfactory chromatographic peak, i.e. without tailing. Since the pH used was much higher than the corresponding pK_a ($pK_{a1} = 3.6$ and $pK_{a2} = 8.2$), no $-OH$ containing form was predominant at such pH. Thus, no additional interaction could take place under those conditions. In the second test, the effect of a salt containing $-OH$ groups was evaluated. A mobile phase using hydrogen phosphate at pH 8.7 was prepared. Results did not show any relevant peak broadening under those conditions. It seemed that the $-OH$ groups of hydrogen phosphate competed with the analyte containing $-OH$, masking the effect of the "active" sites from the microHPLC.

Further studies were carried out to identify the origin of the problem observed. As stated previously, all the species eluted appropriately using conventional flows. Therefore, a revision of the differences between both separation systems is mandatory to identify the interaction source. Both normal-bore and microbore columns are packed with the same material (DVB-PS with ammonium quaternary groups as exchangeable sites). Hence, the secondary interaction cannot be attributed to the stationary phase used. Anyway, the microbore column was connected to the conventional LC system and, as expected, no tailing was observed. Therefore, the responsible of the problem should be a component (non-inert) in the microLC system.

Opposite to the conventional LC system, microLC is equipped with PFS capillaries. To check its possible influence on the problem, several tests were carried out. First, changing only PFS capillaries coming into contact with analytes (loop and valve to column capillaries) by PEEK or steel tubing were not enough to avoid the problem. However, when all PFS capillaries were replaced any additional interaction was not observed, i.e. As(III), As(V), MMA and Se(IV) eluted with a typical chromatographic peak. This experiment confirmed the influence of PFS material in the secondary interaction. It seems that reactive degradation products of fused silica are wrenched from any PFS capillary wall present in the microHPLC system, allowing a secondary interaction with $-OH$ containing analytes on the column.

The pH of the mobile phase might be the reason for the fused silica degradation. A small change in the mobile phase pH from 8.7 to 8.0 was sufficient to avoid peak broadening, evidencing the relevance of pH in this problem. Fused silica is regarded as inert material since it contains only siloxane bonds (Si–O–Si). Because δ bonds in the Si–O–Si moiety are strengthened by $d_{\pi}-p_{\pi}$ interaction, both lone pairs of electrons on oxygen are involved in n interaction [20]. This fact results in the inability of the siloxane moiety for donor–acceptor interaction. However, when pH is increased, although slightly, over 8.5 the basic hydrolysis of silica takes place, silanol groups

are generated and the surface becomes active. Contrary to siloxane, silanol groups are considered as strong adsorption sites and may contribute significantly to solute retention. Nevertheless, the activation of innerwall of PFS capillaries through basic hydrolysis is not enough to produce the additional interaction. Individual injections of the species through the microLC system without the column showed no peak broadening. Taken into account all the experiments achieved (Table 2), when a pH higher than 8.5 is used, reactive degradation products of fused silica containing silanol groups are delivered from the PFS capillaries. These degradation products reach the column where it interacts both with stationary phase and –OH containing analytes.

Finally, an explanation of the additional interaction mechanism is hypothesized. We have not found any paper in the literature which describes the adsorption or reactivity of silanol groups in anionic-exchange LC. Nevertheless, many articles explain the effect of free silanols over silica supports for reversed-phase columns [20]. Hence, the mechanism we propose in this article must be based on the activity of silanol groups in reversed phase. It is well known that non-fully encapped silica-based materials may present severe peak tailing in the chromatography of basic compounds [20]. This is due to the potential interactions between underivatized silanols and tertiary amine molecules, i.e. ion exchange and hydrogen bonding, additionally to the main hydrophobic interactions. Contrary to tertiary amines, species separated in the present work, As(III), As(V), MMA and Se(IV), do not contain positive charges. Therefore, among the aforementioned mechanisms hydrogen bonding is the only interaction that may take place between silanols and those –OH containing analytes.

On the other hand, it is known that different types of silanol groups (vicinal, geminal or isolated) with different acidity can exist in the silica surface [21] and that pK_a values of around 7 are estimated for underivatized silica [22]. The degradation products of PFS capillaries (with unknown molecular structure) should show silanol groups with similar chemical activity and acidic properties. Consequently, at pH 8.7 the silanol reaching the column must exist in ionized form. Taken this into account, the mechanism seems to consist in the interaction between the lone pairs of electrons on oxygen of ionized silanols with the hydrogen of –OH containing analytes (Fig. 3). The hydrogen atom (the positive part of the dipole H–O– in the analyte molecule) is attracted by the negatively charged oxygen of the ionized silanol. Additionally, an electrostatic interaction must take place between the ammonium quaternary groups of the column and the ionized silanols, which are strongly retained on there. The consequence is that silanol groups retained on the column operate like a complementary stationary phase. As a result, –OH containing analytes retention depends on both anion-exchange mechanism of the column and dipole interaction with silanols.

Table 2. Scheme of the secondary interaction study

μ LC capillaries	Mobile phase		Microbore column	Secondary interaction	Corresponding explanation
	Salt	pH			
PFS	NO ₃ ⁻	8.7	Yes	As(III), As(V), Se(IV), MMA	-OH containing analytes present severe peak broadening
PFS	NO ₃ ⁻	10.0	Yes	Not observed for MMA	When pH is much higher than the second pK _a of MMA, the stable deprotonated form does not show any peak broadening.
PFS	HPO ₄ ²⁻	8.7	Yes	No	-OH groups of HPO ₄ ²⁻ masks the effect of the active sites from the microHPLC leading to an adequate elution
PEEK (sample cap.) ^a PFS (rest of cap.) ^b	NO ₃ ⁻	8.7	Yes	As III, As V, Se IV, MMA	The PFS capillaries where analytes flow through are not the only responsible of the secondary interaction
PEEK or steel	NO ₃ ⁻	8.7	Yes	No	Reactive groups are wrenched from any of the PFS capillaries interacting with the -OH containing analytes on the column.
PFS	NO ₃ ⁻	8.0	Yes	No	At pH below 8.5 the basic hydrolysis of siloxane groups from the PFS capillaries does not take place. Hence, no reactive silanol can contribute to solute retention
PFS	NO ₃ ⁻	8.7	No ^c	No	Secondary interaction also involves the exchange between the ionized silanol groups with quaternary ammonium groups of the column

^a Capillaries where analytes flow through. Injections loop and valve to column.^b Capillaries where analytes do not flow through. Remaining capillaries in microLC system previous to switching valve.^c Experiment carried out connecting directly the switching valve to micronebulizer.

Suggested mechanism of additional interaction

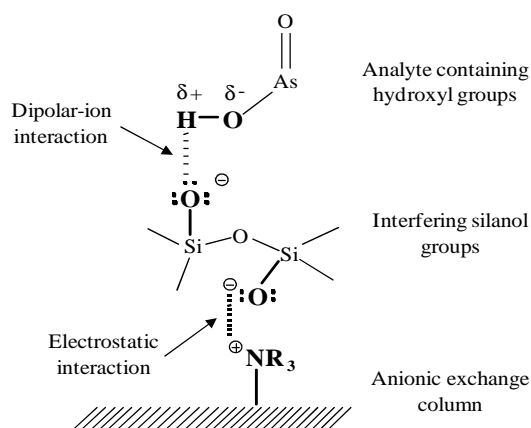


Figure 3. Schematic presentation of the hypothesized mechanism for the additional interaction.

A similar interaction is described by El Tayar et al. in the determination of monosubstituted benzenes using silica-based reversed-phase columns [23]. In this case, the unexpected retention of solutes containing hydrogen-bond accepting substituents is due to the formation of strong hydrogen bonds with the free silanol groups. Opposite to this, in the present work, ionized silanols cannot show hydrogen-bond donor capability. For this reason, no hydrogen bonding between silanol and lone pairs of electrons on oxygen of analytes was observed.

3.2. Strategies to avoid additional interactions

After characterizing the problem, different solutions were tested for the simultaneous determination of As(III), As(V), DMA, MMA, Se(IV), Se(VI) and Cr(VI) using microHPLC–ICP–MS.

First, all the PFS capillaries were replaced by PEEK ones to avoid that ionized silanol groups reached the column. No changes in the mobile phase were required and thus, ammonium nitrate at pH 8.7 was used. Gradient conditions applied are summarized in Table 1 (program 1). As can be seen in Fig. 4a, the baseline separation of all the species were achieved without any extreme peak broadening in less than 11 min.

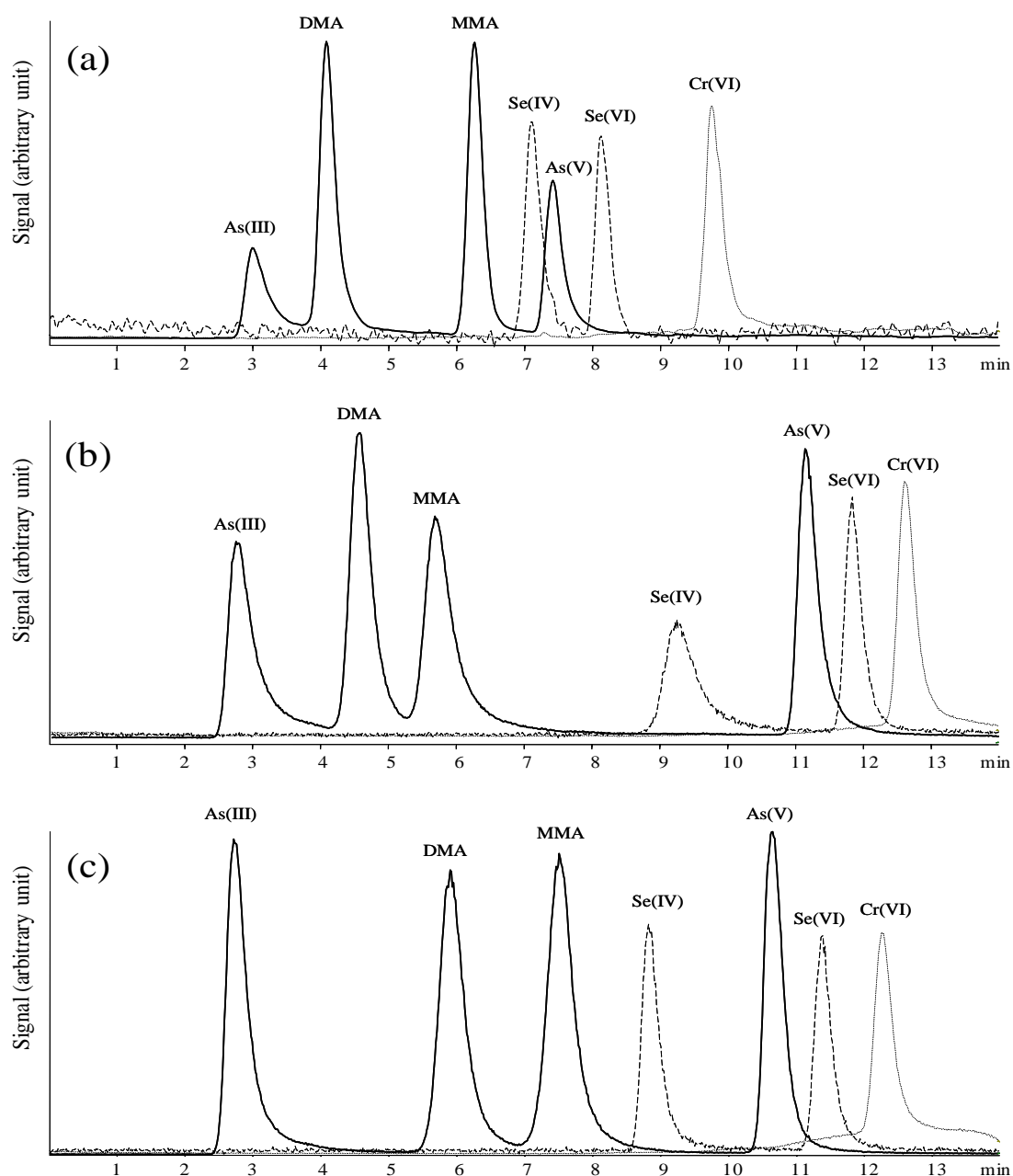


Figure 4. Optimized anion-exchange separation of each species using different experimental conditions. MicroHPLC–ICP–MS chromatograms obtained after standard solution injection of $50 \mu\text{g L}^{-1}$ as As, Se, or Cr of each species. (a) Mobile phase based on ammonium nitrate at pH 8.7 Substitution of PFS capillaries by PEEK. (b) Mobile phase based on ammonium nitrate at pH 8.0. PFS capillaries used. (c) Mobile phase based on a mixture of $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ and NH_4NO_3 at pH 8.7. PFS capillaries used.

In a second test, PFS capillaries were used but the pH of the mobile phase was lowered to 8.0. Under such circumstances, the basic hydrolysis of siloxane groups could not take place. At that value, some changes in the mobile phase composition and gradient program were carried out to avoid the overlapping of DMA and MMA peaks and an excessively high elution time for the more retained species. Table 1 (program 2) shows the optimum separation conditions. Although retention time for the latterly eluted analytes were higher than the corresponding at pH 8.7, the separation of all the species was achieved in less than 14 min (Fig. 4b).

The last solution consisted in the addition of $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ to the mobile phase. As $-\text{OH}$ groups of this salt masks the effect of ionized silanol groups generated from PFS capillaries at pH 8.7, secondary interactions were not observed. However, Cr(VI) cannot be eluted with a mobile phase containing $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ [6]. Therefore, a gradient based on a mixture of $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ and NH_4NO_3 was used. Under these conditions, 13 min were needed to achieve good baseline separation (Fig. 4c). The optimum mobile phases composition and gradient are shown in Table 1 (program 3). It has to be remarked that notable increment of the m/z 53 baseline at 11 min was obtained under these conditions, which might hamper the determination of Cr(VI) at low concentrations (below 1 pbb). On the contrary, the addition of $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ led to better peak shapes for As(III) , As(V) and Se(IV) . Anyway, a more detailed characterization is required, so the effect of $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ and NH_4NO_3 at different pH and composition is currently under study.

Once the problem described in this paper has been solved, present research is focused on developing an analytical method for trace speciation of As, Se and Cr species taking profit of the improved analytical characteristics observed from the use of microHPLC, specially better efficiency separation, shorter analysis time and lower limits of detection.

4. CONCLUSIONS

PEEK covered fused silica, the best material to build capillaries with suitable features (ruggedness, low tendency to clog) for a microLC system can pose some drawbacks when used in a separation method. Mobile phase pH is critical, as at pH value of 8.7, slightly higher than its limit of stability, fused silica is hydrolyzed and dissolution products can, finally, reach the column. These products, containing ionized silanol groups, are retained in the analytical anion-exchange column and generate secondary interactions additional to the main one, ionic exchange. Under these circumstances, chemical species containing hydroxyl groups, stable at the working pH, such as those studied in the present work – As(III) , As(V) , MMA and Se(IV) – can suffer these additional interactions leading to severe peak tailing or even to the absence of

chromatographic peak. Hence, the possible influence of PFS capillaries must be taken into account in speciation studies involving the use of mobile phases pH above 8.5.

A mechanism based on hydrogen bonding has been proposed for the secondary interaction. This interaction can be eliminated by replacing the PFS capillaries by PEEK ones, lowering pH to a value where no basic hydrolysis of silica occurs, or introducing a “masking” agent, such as hydrogen phosphate, in the mobile phase. The three mentioned solutions have been tested and found as suitable in the present work. Notably, the last approach seems an interesting and promising way to improve chromatographic peak shape of most analytes studied.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was partially supported by Generalitat Valenciana through the research project GV05/120. ICP-MS measurements were made at the Servei Central d'Instrumentació Científica (SCIC), Universitat Jaume I.

We would like to thank Dr. F. Hernández for their useful comments and help.

REFERENCES

- [1] S.J. Ray, F. Andrade, G. Gamez, D. McClenathan, D. Rogers, G. Schilling, W. Wetzel, G.M. Hieftje, *J. Chromatogr. A* 1050 (2004) 3.
- [2] E. Terlecka, *Environ. Monit. Assess.* 107 (2005) 259.
- [3] I. Ali, C.K. Jain, *J. Environ. Anal. Chem.* 84 (2004) 947.
- [4] C. B'Hymer, J.A. Caruso, *J. Chromatogr. A* 1045 (2004) 1.
- [5] C. B'Hymer, J.A. Caruso, *J. Chromatogr. A* 1114 (2006) 1.
- [6] A.F. Roig-Navarro, Y. Martínez-Bravo, F.J. López, F. Hernández, *J. Chromatogr. A* 912 (2001) 319.
- [7] Y. Martínez-Bravo, A.F. Roig-Navarro, F.J. López, F. Hernández, *J. Chromatogr. A* 926 (2001) 265.
- [8] T. Lindemman, A. Prange, W. Dannecker, B. Neidhard, *Fresenius J. Anal. Chem.* 368 (2000) 214.
- [9] A. Woller, H. Garraud, J. Boisson, A.M. Dorthe, P. Fodor, O.F.X. Donard, *J. Anal. At. Spectrom.* 13 (1998) 141.
- [10] K.L. Ackley, K.L. Sutton, J.A. Caruso, *J. Anal. At. Spectrom.* 15 (2000) 1069.
- [11] H. Garraud, A. Woller, P. Fodor, O.F.X. Donard, *Analyst* 102 (1997) 25.

- [12] J.L. Todolí, J.M. Mermet, Trends Anal. Chem. 24 (2005) 107.
- [13] G. Rozing, M. Serwe, H.G. Weissgerber, B. Glatz, Am. Lab. 33 (2001) 26.
- [14] A. Castillo, A.F. Roig-Navarro, O.J. Pozo, Anal. Chim. Acta 577 (2006) 18.
- [15] Reference Manual 1100 Series, Agilent, Germany, 2000.
- [16] J.W. Dolan, LC-GC Eur. 14 (2001) 14.
- [17] S. Simon, H. Tran, F. Pannier, M. Potin-Gautier, J. Chromatogr. A 1024 (2004) 105.
- [18] F. Séby, M. Potin-Gautier, E. Giffaut, G. Borge, O.F.X. Donard, Chem. Geol. 171 (2001) 173.
- [19] M.M. Sena, I.S. Scarminio, K.E. Collins, C.H. Collins, Talanta 53 (2000) 453.
- [20] J. Nawrocki, J. Chromatogr. A 779 (1997) 29.
- [21] A. Méndez, E. Bosch, M. Rosés, U.D. Neue, J. Chromatogr. A 986 (2003) 33.
- [22] U.D. Neue, C.H. Phoebe, K. Tran, Y.F. Cheng, Z. Lu, J. Chromatogr. A 925 (2001) 49.
- [23] N. El Tayar, A. Tsantili-Kakoulidou, T. Roethlisberger, B. Testa, J. Gal, J. Chromatogr. 439 (1988) 237.

2.3. POTENCIAL DE LAS COLUMNAS MICROBORE ACOPLADAS A ICP-MS EN ESPECIACIÓN DE As Y Se

En aguas naturales, el arsénico se encuentra predominantemente como arsenito y arseniato, mientras que las formas metiladas DMA y MMA, menos tóxicas, son generadas por microorganismos en medio oxidante.¹ El selenio, esencial para el organismo a bajas concentraciones pero tóxico a elevadas, se encuentra en las aguas naturales fundamentalmente como Se(IV) y Se(VI).² Además, la prevención química del cáncer está asociada a las sales inorgánicas de selenio, selenoaminoácidos y otros compuestos organoselénicos, de aquí la importancia en determinarlos conjuntamente.^{3,4} El ICP-MS, dada su capacidad multielemental es el detector idóneo para este análisis,⁵ a pesar de que su acoplamiento con la cromatografía líquida no está exento de problemas. La introducción de elevadas cantidades de disolventes orgánicos y sales al plasma, necesarias para separar los distintos compuestos, producen efectos depresores de la señal.⁶ El uso de sistemas de bajo flujo, columnas de 0.5–2.1 mm de diámetro interno (microbore) conjuntamente con micronebulizadores, puede reducir dichos efectos. El aerosol generado, más fino y menos disperso, presenta mayor eficiencia de transporte de masa y desolvatación, cosa que se traduce en una mejora significativa de la sensibilidad.⁷ Por otra parte, las columnas microbore deberían proporcionar mayor eficiencia de separación cromatográfica que las convencionales, permitiendo determinaciones más rápidas y exactas.⁸ Sin embargo, son mucho más susceptibles a sufrir dispersión del volumen de muestra, cosa que provoca grandes ensanchamientos de los picos cromatográficos, por lo que su uso requiere una reducción exhaustiva de todas las conexiones del sistema.⁹ Es posiblemente por este inconveniente que el número de publicaciones que describen la utilización de microcolumnas sea tan limitado,¹⁰ dando lugar en muchos casos a resultados poco satisfactorios.^{11,12}

En el presente trabajo se han explorado las ventajas, inconvenientes y limitaciones del acoplamiento microHPLC-ICP-MS, aclarando las controversias que existían sobre su potencial real. Para realizar esta caracterización, se desarrolló un método para la determinación simultánea de los compuestos de As y Se comentados

anteriormente, una vez resuelto el problema de las interacciones adicionales descritas en el **artículo científico 1**.

La reducción del volumen extracolumna, tal y como se esperaba, es imprescindible para no comprometer la adecuada resolución de los picos cromatográficos. Pero, a pesar que este ensanchamiento se atribuía a las conexiones del HPLC, el capilar acoplado al micronebulizador resultó ser clave. Después de caracterizar distintos sistemas de nebulización, el uso de un micronebulizador HEN-100 con un capilar de Teflón de 250 mm x 0.10 mm proporcionó los mejores resultados.

Las fases móviles han demostrado tener una gran influencia en la correcta elución de los picos, pudiendo comprometer también la resolución cromatográfica. La mejor opción resultó ser un gradiente de NH_4NO_3 y $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ a pH 8.3.

La reducción del diámetro interno de las columnas cromatográficas, contrariamente a lo que se afirma en algunos trabajos,¹³ no comporta ninguna mejora en la eficiencia de la separación. Cuando se adapta un método desarrollado para columnas convencionales a columnas microbore se debe seleccionar la misma velocidad lineal de la fase móvil, lo que supone mantener constante la siguiente expresión:¹⁴

$$\text{constante} = F / L \cdot d_c^2 \quad (1)$$

siendo F el flujo cromatográfico, L la longitud de la columna y d_c el diámetro de la columna. De este modo, la reducción del diámetro interno debe ir acompañada de una disminución proporcional del flujo cromatográfico, para conseguir una separación equivalente a la obtenida con una columna convencional de la misma longitud. Por otro lado, hay que tener en cuenta que la cantidad de muestra inyectada depende del volumen de la columna. Al reducir el diámetro interno disminuye también la cantidad de fase estacionaria disponible para interaccionar con los analitos, por lo que se debe mantener constante la relación entre el volumen de muestra y el de la columna. Esto se traduce en una misma banda de analito a lo largo de la columna que, en caso de estar empaquetada con el mismo tamaño de partícula, experimenta los mismos procesos de dispersión, dando lugar a idénticas anchuras de pico. Por

consiguiente, la reducción del diámetro interno no supone un incremento en el número de platos teóricos ni en la concentración relativa de los picos.

Por el contrario, de acuerdo con la ecuación de van Deemter, el menor tamaño de partícula con el que suelen estar empaquetadas las columnas microbore sí debe proporcionar mejores eficiencias. Este punto se verificó comparando la columna microbore utilizada en el presente trabajo (PRP-X100 150 mm x 1 mm, 3 μm) con una del mismo tipo convencional (PRP-X100 250 mm x 4.1 mm, 10 μm). Los resultados mostraron aproximadamente el doble de eficiencia para la columna microbore, tal y como cabía esperar, teniendo en cuenta la diferente longitud entre ambas. La correspondiente mejora en la resolución hizo posible aumentar la velocidad lineal de la fase móvil, reduciendo el tiempo de análisis a menos de 5 minutos.

La metodología desarrollada se validó satisfactoriamente para agua residual depurada y no depurada, obteniendo límites de detección en el rango de 0.03-0.04 $\mu\text{g L}^{-1}$ para los compuestos de arsénico y de 0.35 $\mu\text{g L}^{-1}$ para los de selenio. En el caso del MMA se observó una pequeña contribución de la interferencia poliatómica $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$ debido a la presencia de cloruro en la matriz, por lo que se tuvo que utilizar una ecuación de corrección. Por este motivo, el LOD para el MMA dependerá notablemente del contenido salino en las muestras.

En definitiva, se puede afirmar que el uso del acoplamiento microHPLC-ICP-MS en especiación de As y Se permite disminuir de manera significativa el tiempo de análisis y el consumo de muestra y fase móvil sin sacrificar la sensibilidad ni la resolución de los picos cromatográficos.

2.3.1. Bibliografía

1. Villaescusa, I.; Bollinger, J.C. *Arsenic in drinking water: sources, occurrence and health effects (a review)*. Rev. Environ. Sci. Biotechnol. **2008**, 7, 307-323.
2. B'Hymer, C.; Caruso, J.A. *Selenium speciation analysis using inductively coupled plasma-mass spectrometry*. J. Chromatogr. A **2006**, 1114, 1-20.
3. Pan, F.; Tyson, J.F.; Uden, P.C. *Simultaneous speciation of arsenic and selenium in human urine by high-performance liquid chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry*. J. Anal. At. Spectrom. **2007**, 22, 931-937.
4. Le, X.C.; Lu, X.; Li, X.F. *Arsenic speciation*. Anal. Chem. **2004**, 76, 26A-33A.
5. Komorowicz, I.; Baralkiewicz, D. *Arsenic and its speciation in water samples by high performance liquid chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry—Last decade review*. Talanta **2011**, 84, 247-261.
6. B'Hymer, C.; Caruso, J.A. *Arsenic and its speciation using high-performance chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry*. J. Chromatogr. A **2004**, 1045, 1-13.
7. Todolí, J.L.; Mermet, J.M. *Sample introduction systems for the analysis of liquid microsamples by ICP-AES and ICP-MS*. Spectrochim. Acta Part B **2006**, 61, 239-283.
8. Jerkovich, A.D.; Mellors, J.S.; Jorgenson, J.W. *The use of micrometer-sized particles in ultrahigh pressure liquid chromatography*. LC-GC North America **2003**, 21, 600-610.
9. Prüb, A.; Kempter, C.; Gysler, J.; Jira, T. *Extracolumn band broadening in capillary liquid chromatography*. J. Chromatogr. A **2003**, 1016, 129-141.
10. Todolí, J.L.; Grotti, M. *Fast determination of arsenosugars in algal extracts by narrow bore high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry*. J. Chromatogr. A **2010**, 1217, 7428-7433.
11. Sun, Y.C.; Lee, Y.S.; Shiah, T.L.; Lee, P.L.; Tseng, W.C.; Yang, M.H. *Comparative study on conventional and low-flow nebulizers for arsenic speciation by means of microbore liquid chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometry*. J. Chromatogr. A **2003**, 1005, 207-213.

12. Woller, A.; Garraud, H.; Boisson, J.; Dorthe, A.M.; Fodor, P.; Donard, O.F.X. *Simultaneous speciation of redox species of arsenic and selenium using an anion-exchange microbore column coupled with a micro-concentric nebulizer and an inductively coupled plasma mass spectrometer as detector*. J. Anal. At. Spectrom. **1998**, 13, 141-149.
13. Garraud, H.; Woller, A.; Fodor, P.; Donard, O.F.X. *Trace elemental speciation by HPLC using microbore columns hyphenated to atomic spectrometry: A review*. Analysis **1997**, 25, 25-31.
14. Dolan, J.W. *Reducing Column Diameter in gradient elution—A case study*. LC-GC Europe **2001**, 14, 14-17.

2.3.2. Artículo científico 2

“Capabilities of microbore columns coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry in speciation of arsenic and selenium”

A. Castillo, A.F. Roig-Navarro and O.J. Pozo.

Journal of Chromatography A, 1202 (2008) 132–137.

Journal of Chromatography A, 1202 (2008) 132–137



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Chromatography A

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chroma



Capabilities of microbore columns coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry in speciation of arsenic and selenium

A. Castillo, A.F. Roig-Navarro*, O.J. Pozo

Research Institute for Pesticides and Water, Universitat Jaume I, Avda. Sos Baynat s/n, E-12071 Castelló, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 February 2008
Received in revised form 28 May 2008
Accepted 2 June 2008
Available online 1 July 2008

Keywords:

Micro-liquid chromatography
Speciation
Arsenic
Selenium
Anion exchange
Multielemental determination
Inductively coupled plasma
Wastewater analysis

ABSTRACT

The performance of microHPLC-microconcentric nebulizer-inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) coupling for the simultaneous determination of As(III), As(V), monomethylarsenic acid (MMA), dimethylarsinic acid (DMA), selenite (SeIV) and selenate (SeVI) in water was evaluated. The accurate reduction of the off-column dead volume, specially the capillary of the micronebulizer, as well as the optimization of chromatographic conditions led to the claimed advantages expected for microbore columns: a significant diminution of sample and solvent consumption without sacrificing sensitivity and the overall resolution in faster analysis time (less than 5 min). Detection limits are in the range 0.03–0.04 $\mu\text{g L}^{-1}$ for arsenic species and 0.35 $\mu\text{g L}^{-1}$ for selenium species. The developed method was validated by analysing different spiked environmental water samples. Linearity, tested up to 50 $\mu\text{g L}^{-1}$, showed correlation coefficients above 0.999 and no matrix effect for high saline water samples. Good accuracy and repeatability was obtained for spiked influent and effluent water treatment plant.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Trace arsenic and selenium speciation analysis are normally performed by HPLC–ICP-MS coupling [1–3]. In natural waters, arsenic exists predominantly in inorganic forms (arsenite and arsenate), while the methylated less toxic metabolites dimethylarsinic (DMA) and monomethylarsonic (MMA) are generated by microorganisms under oxidizing conditions [2,4]. Selenium, an essential nutrient for humans at low concentration but a toxin at higher concentration, is mostly found in natural waters as selenite (SeIV) and selenate (SeVI) [3,5]. Furthermore, cancer chemoprevention has been associated with inorganic selenium salts, selenoamino acids and other organoselenium compounds. A reason for the simultaneous speciation of both elements can be found in the counteraction of its toxic effects [4]. Several methods have been reported to this end, taken profit of the ICP-MS multielemental capability [5–7]. A known problem of this coupling is the introduction of large amounts of solvents and salts into the plasma that can cause detrimental effects in the signal [2,3,8]. Using low flow systems – microbore columns together with low flow nebulizers – seems the choice to solve such a problem. Micronebulizers yield a finer and less dispersed aerosol and show higher mass

transport efficiencies. When used in conjunction with cooled spray chambers, that reduces vapor pressure [9] as well as background noise, provides sensitivities suitable for ultratrace determinations [8–11].

Microbore columns are usually packed with smaller particles than the corresponding normal-bore ones, providing higher efficiency. Consequently, greater resolving power and lower detection limits can be expected [12]. In addition, the smaller particles are often packed in shorter columns to achieve faster analysis times but sacrificing separation efficiency.

On the other hand, since low flow separations are more sensitive to sample volume dispersion, special care must be taken into account with the dead volume as well as the robustness of the system [9,13]. Thus, to reach full capabilities of microbore columns, LC systems with reduced dead volume and optimized flow geometries of all connection capillaries are required.

In spite of the aforementioned advantages, the number of published papers in the literature for any application using microbore columns remains limited [11,14]. The aim of this work is to explore the capabilities of microHPLC–ICP-MS in trace speciation analysis. To test those capabilities, a method for the simultaneous determination of arsenite, arsenate, monomethylarsonic, dimethylarsinic, selenite and selenate in water using an anionic exchange microbore column is optimized and validated. Effect of extracolumn band broadening is studied and a rough comparison with conventional chromatographic methods is conducted. Potential application of

* Corresponding author. Tel.: +34 964 387359; fax: +34 964 387368.
E-mail address: roig@qfa.uji.es (A.F. Roig-Navarro).

JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A

J. Chromatogr. A, 1202 (2008) 132–137

Received: 28 February 2008; Accepted: 2 June 2008; Published online: 1 July 2008 in ScienceDirect
(www.sciencedirect.com) DOI: 10.1016/j.chroma.2008.06.031

Capabilities of microbore columns coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry in speciation of arsenic and selenium

A. Castillo, A.F. Roig-Navarro, O.J. Pozo

Research Institute for Pesticides and Water, Universitat Jaume I, E-12071 Castelló, Spain

ABSTRACT

The performance of microHPLC-microconcentric nebulizer-inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) coupling for the simultaneous determination of As(III), As(V), monomethylarsenic acid (MMA), dimethylarsinic acid (DMA), selenite (SeIV) and selenate (SeVI) in water was evaluated. The accurate reduction of the off-column dead volume, specially the capillary of the micronebulizer, as well as the optimization of chromatographic conditions led to the claimed advantages expected for microbore columns: a significant diminution of sample and solvent consumption without sacrificing sensitivity and the overall resolution in faster analysis time (less than 5 min). Detection limits are in the range 0.03–0.04 $\mu\text{g L}^{-1}$ for arsenic species and 0.35 $\mu\text{g L}^{-1}$ for selenium species. The developed method was validated by analysing different spiked environmental water samples. Linearity, tested up to 50 $\mu\text{g L}^{-1}$, showed correlation coefficients above 0.999 and no matrix effect for high saline water samples. Good accuracy and repeatability was obtained for spiked influent and effluent water treatment plant.

KEYWORDS

Micro-liquid chromatography; Speciation; Arsenic; Selenium; Anion exchange; Multielemental determination; Inductively coupled plasma; Wastewater analysis

1. INTRODUCTION

Trace arsenic and selenium speciation analysis are normally performed by HPLC–ICP–MS coupling [1–3]. In natural waters, arsenic exists predominantly in inorganic forms (arsenite and arsenate), while the methylated less toxic metabolites dimethylarsinic (DMA) and monomethylarsonic (MMA) are generated by microorganisms under oxidizing conditions [2,4]. Selenium, an essential nutrient for humans at low concentration but a toxin at higher concentration, is mostly found in natural waters as selenite (SeIV) and selenate (SeVI) [3,5]. Furthermore, cancer chemoprevention has been associated with inorganic selenium salts, selenoamino acids and other organoselenium compounds. A reason for the simultaneous speciation of both elements can be found in the counteraction of its toxic effects [4]. Several methods have been reported to this end, taken profit of the ICP–MS multielemental capability [5–7]. A known problem of this coupling is the introduction of large amounts of solvents and salts into the plasma that can cause detrimental effects in the signal [2,3,8]. Using low flow systems – microbore columns together with low flow nebulizers – seems the choice to solve such a problem. Micronebulizers yield a finer and less dispersed aerosol and show higher mass transport efficiencies. When used in conjunction with cooled spray chambers, that reduces vapor pressure [9] as well as background noise, provides sensitivities suitable for ultratrace determinations [8–11].

Microbore columns are usually packed with smaller particles than the corresponding normal-bore ones, providing higher efficiency. Consequently, greater resolving power and lower detection limits can be expected [12]. In addition, the smaller particles are often packed in shorter columns to achieve faster analysis times but sacrificing separation efficiency.

On the other hand, since low flow separations are more sensitive to sample volume dispersion, special care must be taken into account with the dead volume as well as the robustness of the system [9,13]. Thus, to reach full capabilities of microbore columns, LC systems with reduced dead volume and optimized flow geometries of all connection capillaries are required.

In spite of the aforementioned advantages, the number of published papers in the literature for any application using microbore columns remains limited [11,14]. The aim of this work is to explore the capabilities of microHPLC–ICP–MS in trace speciation analysis. To test those capabilities, a method for the simultaneous determination of arsenite, arsenate, monomethylarsonic, dimethylarsinic, selenite and selenate in water using an anionic exchange microbore column is optimized and validated. Effect of extracolumn band broadening is studied and a rough comparison with conventional chromatographic methods is conducted. Potential

application of the method developed has been assessed through spiked influent and effluent water treatment plant analysis.

2. EXPERIMENTAL

2.1. Instrumentation

The microHPLC system consisted of an Agilent 1100 Series (Agilent, Waldbronn, Germany) binary pump and auto injector with a programmable sample loop (20 μ L maximum). The separations were performed on a PRP-X100 (Hamilton, Reno, NV, USA) anion exchange column (150 mm \times 1 mm, 3 μ m).

The microbore column was connected directly to a Micromist nebulizer and a high-efficiency nebulizer (HEN) using its own capillary (480 mm \times 0.25 mm and 480 mm \times 0.10 mm, respectively). An HP 4500 ICP-MS (Yokogawa Analytical Systems, Tokyo, Japan) was used in this work. For microHPLC–ICP-MS data acquisition, the “time resolved analysis” mode was used with 1 s of integration time per mass. Measurement masses selected were: m/z 75 for arsenic and 77 for selenium. Operational conditions are summarized in Table 1.

For tuning of ICP-MS, a solution containing 10 μ g L⁻¹ of As and Se made up in double deionised water filtered through 0.22 μ m was monitored at m/z 75 and 77; the ion intensity was optimized. Then, resolution and mass axis were also optimized.

2.2. Standards and reagents

NaAsO₂ (analytical reagent, a.r.), Na₂HAsO₄·7H₂O (a.r.), Na(CH₃)₂AsO₂·3H₂O (Biochemika), Na₂SeO₃·5H₂O (Chemika) and Na₂SeO₄ (Chemika) were from Fluka (Buchs, Switzerland) and Na₂CH₃AsO₃·6H₂O (a.r.) was delivered by Carlo Erba (Milano, Italy). Stock solutions of arsenic and selenium containing about 1000 mg L⁻¹ As, Se were prepared in water and maintained at 4 °C. Appropriate dilutions of the stock solution were prepared daily, by weight, using double deionised water to obtain the required concentration.

The mobile phases used ammonium nitrate buffers prepared from NH₄NO₃ (a.r., Scharlau, Barcelona, Spain) and phosphate buffers from NH₄H₂PO₄ (a.r., Merk). The pH value was adjusted by the addition of NH₃ (Trace Select, Fluka). These solutions were filtered through a 0.22 μ m membrane before use.

All the aqueous solutions were prepared with Milli Q Gradient A10 (Millipore, Molsheim, France) water (18.2 M Ω cm).

Table 1. Optimized operational conditions and gradient programme for microHPLC-ICP-MS

ICPMS	HP 4500
Forward power	1330 W
Plasma gas flow	Ar, 15 L min ⁻¹
Auxiliary gas flow	Ar, 1 L min ⁻¹
Carrier gas flow	Ar, 0.73 L min ⁻¹
Make up gas flow	Ar, 0.41 L min ⁻¹
Sample depth	5.7 mm
Monitoring masses	m/z = 75, 77
Acquisition mode	Time resolve analysis
Integration time/mass	1 s
Electron multiplier	– 1800 V
Spray chamber	2 °C
microHPLC system	Capillary HP1100
Column	Hamilton PRP-X100 (150 x 1 mm, 3 µm)
Flow-rate	100 µL min ⁻¹
Injected volume	15 µL

Gradient programme

	Time (min)						
	0	0.49	0.5	1.49	1.5	3.99	4
% A	100	100	25	25	0	0	100
% B	0	0	75	75	100	100	0
Mobile phase	A: 5 mM NH ₄ NO ₃ , 1 mM NH ₄ H ₂ PO ₄ , pH 8.3 with ammonia						
	B: 80 mM NH ₄ NO ₃ pH 8.3 with ammonia						

2.3. Method development

In a first stage, the contribution of the nebulization step to the dead volume was evaluated. To this end, flow injection acquisition (FIA) of $50 \mu\text{g L}^{-1}$ of arsenite were conducted employing the Micromist as well as HEN micronebulizers and the corresponding peak widths were compared. Then, an accurate optimization of the mobile phase composition, pH, flow rate, chromatographic gradient and injection volume were carried out. Afterwards, the $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$ interference on MMA peak was corrected by monitoring of $^{40}\text{Ar}^{37}\text{Cl}^+$, which gave a chromatographic peak which did not affected selenium speciation. Concentrations of chloride varying between 1 and 1000 mg L^{-1} were injected to check the suitability of the polyatomic interference correction applied.

2.4. Method validation

Linearity was tested in the concentration range $0.1\text{--}50 \mu\text{g L}^{-1}$ for arsenic and selenium species. Possible matrix effects on the calibration were estimated by the standard additions method for a surface water sample with high saline content. Accuracy and precision ($n = 5$) of the method were assessed through the analysis of influent and effluent water treatment plant from the Castelló province, containing around 100 mg L^{-1} of chloride, spiked at two levels: low concentration, $0.2 \mu\text{g L}^{-1}$ (as As) of each arsenic species and $1 \mu\text{g L}^{-1}$ (as Se) of each selenium species; high concentration, $2 \mu\text{g L}^{-1}$ (as As) and $10 \mu\text{g L}^{-1}$ (as Se). Repeatability of the method was evaluated by the coefficient of variation (CV) of the accuracy experiments. The detection limit, defined as three times the baseline fluctuations, was determined in an effluent water treatment plant containing As(III), $0.33 \mu\text{g L}^{-1}$; As(V) $0.69 \mu\text{g L}^{-1}$; Se(VI) $1.3 \mu\text{g L}^{-1}$; and spiked with DMA, $0.20 \mu\text{g L}^{-1}$; MMA, $0.20 \mu\text{g L}^{-1}$; and Se(IV), $1.0 \mu\text{g L}^{-1}$. The chloride concentration was about 50 mg L^{-1} .

Spiked solutions were prepared daily diluting, by weight, the appropriate amount of arsenic and selenium standards of 100 mg L^{-1} in water from a treatment plant filtered through a $0.22 \mu\text{m}$ pore diameter membrane.

2.5. Recommended procedure

A $15 \mu\text{L}$ aliquot of water sample filtered through $0.22 \mu\text{m}$ pore diameter membrane is directly injected into the microHPLC–ICPMS system. Anion exchange separation is carried out with a 150 mm length microbore column (1 mm I.D. , $3 \mu\text{m}$) by gradient elution (Table 1) using two mobile phases: A ($5 \text{ mM NH}_4\text{NO}_3$, $1 \text{ mM NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, pH 8.3) and B ($80 \text{ mM NH}_4\text{NO}_3$, pH 8.3) at a flow rate of $100 \mu\text{L min}^{-1}$. Previously the column is conditioned by pumping solution A. Under these

conditions, the separation of As(III), DMA, MMA, As(V), Se(IV) and Se(VI) takes place in around 5 min including the re-equilibration of the column. The outlet of the LC system is coupled to the ICP-MS through HEN nebulizer via Teflon capillary tubing (0.10 mm I.D.). In order to correct accurately the $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}$ interference on MMA peak, correction factor between $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}$ and $^{40}\text{Ar}^{37}\text{Cl}$ peak areas should be daily calculated by injecting a 100 mg L^{-1} chloride solution.

3. RESULTS AND DISCUSSION

In order to take full advantage of microHPLC–ICP-MS coupling, extracolumn band broadening has been identified and minimized. Also, the chromatographic separation has been optimized in order to get the highest efficiency together with the minimum plasma disturbance and, consequently, the maximum sensitivity. Mobile phase composition, pH, flow rate and injection volume were evaluated in order to achieve the maximum sensitivity, reproducibility and resolution with minimum analysis time.

3.1. Influence of the nebulizer capillary dead volume on the chromatographic separation

Coupling the microbore column through a micronebulizer is mandatory because of the low analyte transport efficiencies and high dead volumes of the classical ones. In spite of direct injection nebulizers offers 100% analyte transport efficiency, Micromist and HEN pneumatic nebulizers are usually employed [15,16]. The last ones are connected to a spray chamber which only permits the introduction of the finest droplets corresponding to the tertiary aerosol, generating less plasma perturbation and noise [17]. For this reason, Micromist and HEN were the micronebulizers tested in the proposed method.

To compare both micronebulizers, the following FIA experiment was carried out: $5\text{ }\mu\text{L}$ solution, containing $50\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ of As(III), was injected directly to the ICP-MS through the different micronebulizers at a flow rate of $50\text{ }\mu\text{L min}^{-1}$. When Micromist was used retention time (t_R) and full width at half maximum ($W_{1/2}$) higher than HEN were obtained ($t_R = 43.2\text{ s}$ and $W_{1/2} = 14\text{ s}$ versus $t_R = 21.6\text{ s}$ and $W_{1/2} = 10\text{ s}$). As it was previously reported by Sun et al. [18], it seemed that the long dead volume associated to the Micromist transfer line detrimentally affect the shape of the resultant peak, leading to a loss of peak efficiency. In order to evaluate more accurately such effect, capillary nebulizer dead volumes corresponding to both nebulizers were calculated. Micromist was assembled with a $480\text{ mm} \times 0.25\text{ mm}$ capillary, generating a dead volume of $23.6\text{ }\mu\text{L}$. On the other hand, the dead volume associated to the transfer line of HEN ($480\text{ mm} \times 0.10\text{ mm}$) was $3.76\text{ }\mu\text{L}$. Assuming that the extracolumn volume should not exceed a 2% of the column

dead volume (estimated as 94 μL for the microbore column used), the maximum value for connection capillaries should be 1.88 μL . Because Micromist capillary dead volume was significantly higher than the recommended one, considerable peak broadening was obtained. Contrarily, HEN capillary only exceeded slightly it and thus better peak shapes could be achieved. In addition, volume dispersion in capillaries reduces with the sixth power of the diameter [19], which also contributed to the better results using HEN. When the capillary length was minimized to 250 mm, a dead volume of 1.18 μL , smaller than the maximum one recommended, was attained. Therefore, in subsequent experiments the outlet of the LC system was coupled to the ICP-MS through HEN nebulizer via (250 mm \times 0.10 mm) Teflon capillary tubing.

3.2. Optimization of the chromatographic separation

For these experiments, mixed standard solutions containing As(III), As(V), MMA, DMA (50 $\mu\text{g L}^{-1}$ as As) and Se(IV), Se(VI) (50 $\mu\text{g L}^{-1}$ as Se) were injected into the anion-exchange microbore column (150 mm \times 1 mm, 3 μm).

Firstly, a gradient based on NH_4NO_3 were examined. Although completely resolution of all the species were achieved, results were not completely satisfactory because peak tailing was noticed for As(III), As(V) and Se(IV), which can hamper their quantification. Since a previous work showed that the addition of $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ to the mobile phase led to better peak shapes for the above mentioned species [20], a mixture of $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ and NH_4NO_3 was used. As it was expected, a notable improvement of peak shapes was achieved. The best results were attained using a gradient of 5 mM NH_4NO_3 pH 8.3, 1 mM $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ and 80 mM NH_4NO_3 pH 8.3 (Table 1), with a total analysis time of 5 min (Fig. 1).

It has to be remarked that chromatographic separation strongly depends on pH. As can be seen in Fig. 2, DMA and MMA separation was only accomplished at the lower and higher pH values studied, which is a consequence of the deprotonation degree of such species. In addition, a diminution of DMA, MMA and As(V) peak widths was also noticed when pH increased (clearly seen at pH 8.4). Contrary to this, As(III) tailing increased at high pH, which hampered slightly its quantification. According to this, pH 8.3 was chosen as a compromise between good peak resolution and small peak width for the six species studied.

Therefore, both the addition of $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ to the mobile phase and the appropriate selection of pH demonstrated to be a key factor to take profit the potential efficiency of the microbore column used.

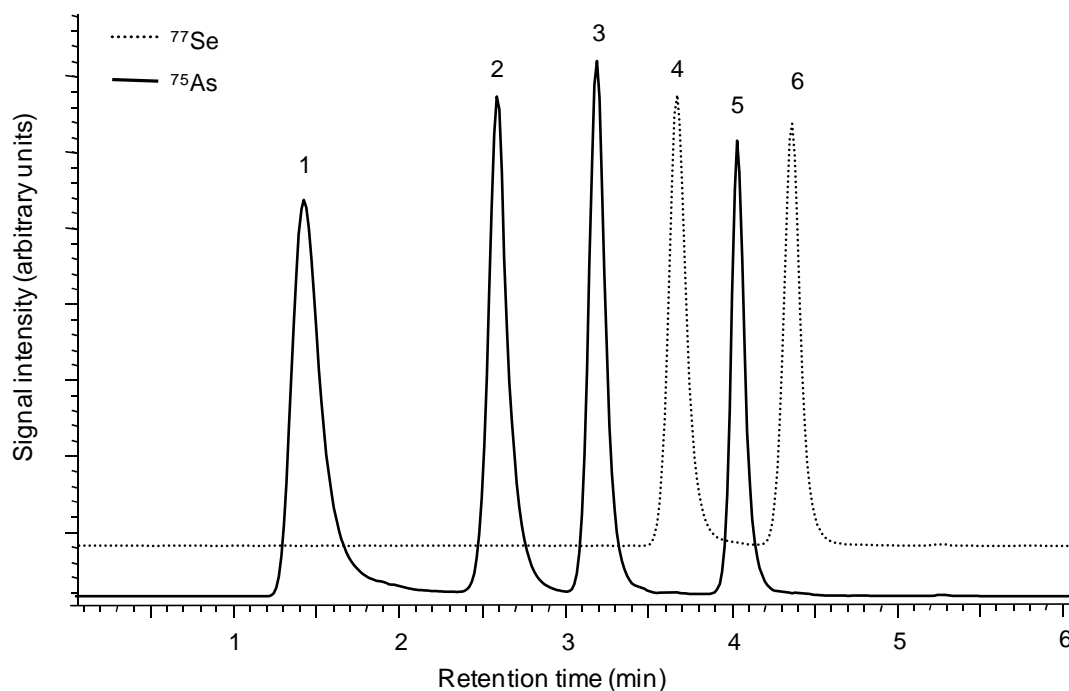


Figure 1. Anion-exchange microHPLC-ICP-MS chromatogram of a standard solution containing $50 \mu\text{g L}^{-1}$ as As or Se for each species using mobile phases based on a mixture of $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ and NH_4NO_3 . Peak identification: (1) As(III), (2) DMA, (3) MMA, (4) Se(IV), (5) As(V), (6) Se(VI).

3.3. Correction of $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$ spectral interference

When samples containing high concentration of chloride were injected under the optimized chromatographic conditions, partial overlapping between the $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$ interference and MMA peaks was noticed, precluding the determination of MMA at low concentration. Since signal due to chloride elution was also detected at m/z 77 ($^{40}\text{Ar}^{37}\text{Cl}^+$), which was not overlapped with any selenium peak, the application of correction equations was evaluated in order to overcome $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$ contribution.

In a first experiment, $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$ and $^{40}\text{Ar}^{37}\text{Cl}^+$ signal ratio was measured for different interferent concentrations. To this end, solutions of NaCl with chloride concentrations up to 1000 mg L^{-1} were injected. The interference was not observed at concentrations below 50 mg L^{-1} . The instrumentally measured ratio of $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$ and $^{40}\text{Ar}^{37}\text{Cl}^+$ showed a constant value of 2.70 (Table 2), which it was different to the ratio (3.13) of the natural abundances of the chlorine ions. Therefore, the correction was applied using the experimental ratio of the polyatomic ions to minimize errors.

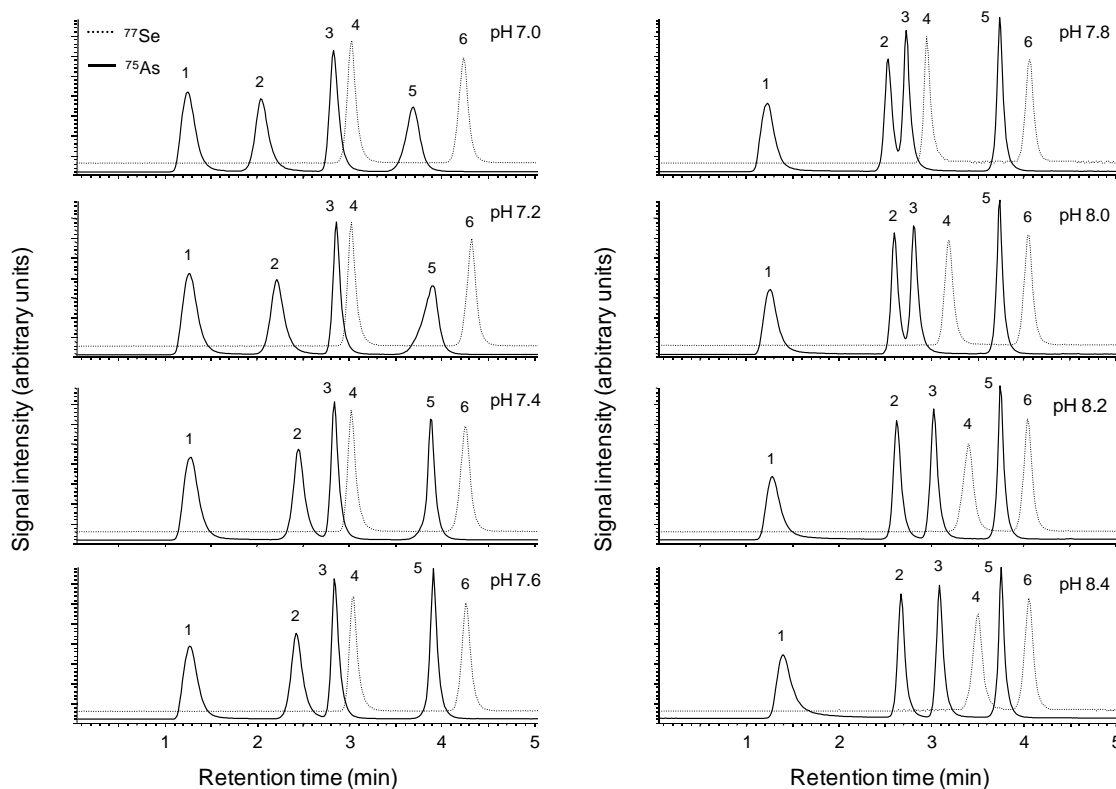


Figure 2. Effect of pH on chromatographic separation using mobile phases based on $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ and NH_4NO_3 and the gradient programme (see text) for standard solutions containing $50 \mu\text{g L}^{-1}$ as As or Se of each species. Peak identification: (1) As(III), (2) DMA, (3) MMA, (4) Se(IV), (5) As(V), (6) Se(VI).

According to this, the following expression was applied for an appropriate quantification of MMA peak:

$$\text{Area (MMA)}_{\text{corrected}} = \text{Area (MMA)}_{\text{measured}} - \text{Area } ({}^{40}\text{Ar}^{37}\text{Cl}^+)_{\text{measured}} \times \text{CF} \quad (1)$$

where CF is the correction factor, $\text{signal } ({}^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+)/\text{signal } ({}^{40}\text{Ar}^{37}\text{Cl}^+)$, calculated daily by injecting an interference check solution containing the interferent, but no analyte.

To explore the suitability of such correction, a real water sample containing around 100 mg L^{-1} chloride was spiked with concentrations of MMA ranging from 50 to 500 ng L^{-1} . Results shown in Table 2 demonstrate a satisfactory correlation between prepared and calculated concentration. Also, a minimum MMA concentration of 100 ng L^{-1} which could be discriminated from ${}^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$ interference is revealed.

Table 2. Effect of chloride concentration on correction factor (CF) and accuracy of the correction equation in a chloride containing water

Chloride content (mg L ⁻¹)	CF ^a	MMA spiked (ng L ⁻¹)	MMA measured (ng L ⁻¹) ^b	MMA corrected (ng L ⁻¹) ^c
50	2.71	50	396	73
		80	417	98
		100	408	105
100	2.68	200	529	207
		300	593	299
1000	2.74	500	827	506

^a Calculated ratio of ⁴⁰Ar³⁵Cl and ⁴⁰Ar³⁷Cl peak areas in double deionized water for different NaCl contents. A constant value of 2.7 was obtained.
^b MMA concentration in a chloride containing water calculated from the MMA peak, without correction.
^c Resulting MMA concentration applying the correction equation ($\text{Area (MMA)}_{\text{corrected}} = \text{Area (MMA)}_{\text{measured}} - \text{Area (}^{40}\text{Ar } ^{37}\text{Cl)}_{\text{measured}} \cdot \text{CF}$).

3.4. Analytical performance characteristics

As a first step, the linearity and matrix effects were checked. Correlation coefficients higher than 0.999 for arsenic and selenium species and minor matrix effects (differences lower than 5%) were obtained (Table 3). Therefore, the analysis of surface water can be performed by external calibration.

Results obtained for accuracy and precision are shown in Table 4. Satisfactory recoveries (ranging from 89 to 106%) and CV values below 9% were obtained in the spiked matrix.

The calculated LODs were $<0.05 \mu\text{g L}^{-1}$ for arsenic species and $0.35 \mu\text{g L}^{-1}$ for both selenium species. It should be remarked that the detection limit of MMA depends on the amount of chloride of the sample. Because of the overlapping between MMA and $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}$ peaks, the higher chloride water content the higher imprecision in the concentration calculated through correction equation. Since the real water sample used to determine the LODs contained a low amount of chloride, the $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}$ peak hardly affected MMA determination and a small detection limit ($0.026 \mu\text{g L}^{-1}$) could be achieved.

Table 3. Calibration curves corresponding to aqueous external standards and standard additions method for surface water sample with high chloride content. The concentration range examined was $0.1\text{--}50 \mu\text{g L}^{-1}$ for each species

	External calibration	Standard additions	Slope deviation (%)
	Slope (counts L μg^{-1})	Slope (counts L μg^{-1})	
As(III)	24946	26165	4.9
DMA	26441	26988	2.1
MMA	25317	26343	4.1
As(V)	26119	27131	3.9
Se(IV)	13471	13876	3.0
Se(VI)	12775	13200	3.3

3.5. Comparison with previously reported methods

Although many arsenic speciation methods based on liquid chromatography coupled to ICP-MS are reported, very few led the simultaneous separation of arsenic and selenium species. Furthermore, the use of microbore columns is even scarcer and we have not found any recent work in the literature which employs these columns to this end. A summary of analytical features from some selected papers, regarded as representative, are shown in Table 5. Traditionally, better

Table 4. Accuracy and precision of the microHPLC–ICP–MS procedure obtained in spiked water samples

Species	Recovery and CV (%) (n = 5)			
	Effluent water treatment plant		Influent water treatment plant	
	High level ^a	Low level ^b	High level	Low level
As(III)	95(3.2)	91(0.9)	90(4.1)	95(0.4)
DMA	105(0.3)	106(5.6)	105(0.7)	98(4.2)
MMA	89(1.5)	95(2.9)	98(3.7)	89(3.1)
As(V)	95(0.1)	94(4.5)	102(5.6)	95(0.2)
Se(IV)	102(1.6)	97(8.9)	95(3.4)	93(1.6)
Se(VI)	105(2.8)	91(4.7)	99(3.6)	89(1.3)

^aAs(III), DMA, MMA, As(V) 2 µg L⁻¹; Se(IV), Se(VI) 10 µg L⁻¹.

^bAs(III), DMA, MMA, As(V) 0.2 µg L⁻¹; Se(IV), Se(VI) 1 µg L⁻¹.

detection limits have been achieved using HPLC–ICP–MS. While microHPLC–ICP–MS led to LOD's above 0.1 µg L⁻¹ for arsenic and 4 µg L⁻¹ for selenium species [18,24,25], LODs lower than or near to 0.1 µg L⁻¹ for arsenic and around 1 µg L⁻¹ for selenium species were obtained for HPLC–ICP–MS [5,21–23]. However, the present work demonstrates that the use of a high efficiency nebulizer within the appropriate diminution of the off-column dead volume and the optimization of the chromatographic separation led to detection limits as low as HPLC–ICP–MS: below 0.04 µg L⁻¹ for arsenic species and still better for selenium ones (0.35 µg L⁻¹). For a proper interpretation, injection volume together with flow rate should be taken into account. The usual values for conventional HPLC are 100 µL and 1 mL min⁻¹, while 5 µL and 50 µL min⁻¹ are the recommended ones using microbore HPLC (15 µL and 100 µL min⁻¹ in this work). The problem due to lower mass introduced to the ICP–MS (a mass-flow sensitive detector) can be overcome with the use of high efficiency nebulizers, which show better mass transport in the nebulization step. However, as reported in the present work, an accurated optimization of that stage should be carried out to get sensitivities as high as those from conventional nebulizers.

On the other hand, Table 5 shows the real advantage of an accurately optimized microHPLC–ICP–MS method: the total analysis time for the determination of the six species under study. Namely, a minimum of 14 min were needed to separate all arsenic and selenium species through a normal-bore column, while the time was reduced to around 5 min with a microbore one. This fact, together with the lower flow rate used, led to a much lesser consumption of solvents and time when a large batch of samples should analysed. In addition, minor sample size is needed, which is specially important for sample limited analysis.

The main characteristic of microbore columns is their smaller internal diameter (0.5–2.1 mm) over conventional columns (3.9–5 mm). The theoretical benefits expected with the reduction of the internal diameter are listed in a review from Garraud et al. [11]: less solvent and sample consumption, greater efficiencies and increased mass sensitivity. This is however a controversial question. In a classical paper, Karlsson and Novotny [26] show that a reduction of inner diameter lowers plate-height when working with three capillary columns (I.D. ranged from 265 to 44 μm). Lee and co-workers [27] found that a 100 μm I.D. column demonstrated approximately 40% lower efficiency but 10-fold higher sensitivity than the 29 μm I.D. column. In a recent paper, Wilson and co-workers [14] found no significant differences in efficiency for columns of 2.1 and 1 mm I.D., but an increase in sensitivity with respect to the conventional column (I.D. 4.6 mm). However, the increased sensitivity could be attributed to the optimization of the detector system used (electrospray ionisation-mass spectrometry). On the other hand, no improvement of chromatographic resolution, peak width or sensitivity is noticed by Hann and co-workers [28] when working with 2.1, 1 and 0.32 mm I.D. columns.

To clarify the apparent controversial finding, an accurate explanation about the different operating conditions of both columns is required. When changing to microbore columns, in order to achieve equivalent gradient conditions –comparable chromatographic conditions–, the follow expression must be held constant [29]:

$$\text{constant} = \frac{F}{L d_c^2} \quad (2)$$

where F is the flow rate, L is the column length and d_c is the column diameter. Therefore, in the case of a microbore column with identical column length that the conventional one, the diminution of the flow rate should be proportional to the reduction of the square of the internal diameter. In order words, when the flow rate is adapted according to Eq. (2), no change in the linear velocity of the mobile phase will be attained. On the other hand, the amount of sample injected depends on the column volume, so the relationship between both volumes should be kept also constant in order to generate the same band of analyte along the column. This means that, if both columns are packed with the same particle size, the analytes will suffer the same dispersion processes into them, leading to identical peak widths. Hence, decreasing the diameter of a column should not increase the number of theoretical plates or the relative peak concentration. Anyway, as shown in the present work, separations as efficient as those obtained with normal-bore columns with low sample and solvent consumption can be achieved with these columns. These being the real advantages. Moreover, microbore columns are usually packed

with smaller particles than the corresponding normal-bore ones. This is a proved way to increase efficiency [12]. So, if higher and narrower peaks could be attained for an optimized separation method, better detection limits can be foreseen.

4. CONCLUSIONS

Extracolumn band broadening should be accurately controlled when working with microbore columns. Nebulizer connexion capillary has been demonstrated a key factor to achieve the expected peak efficiencies. Volume of a capillary, with very low inner diameter, not exceeding 2% of column void volume showed the best peak width. On the other hand, the best separation conditions were obtained with a gradient elution based in a mixed mobile phase containing NH_4NO_3 and $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ at pH 8.3. Narrower peak shapes (better efficiencies) due to phosphate should be emphasized.

The small mass introduced into the ICP-MS, due to the lower flow rate and sample injection employed, is compensated by use of microflow (high efficiency) nebulizer and the proper optimization of the nebulization step.

With an accurate optimization of the micro-HPLC–ICP-MS coupling and separation method, LODs as low as those obtained with conventional HPLC columns can be obtained. Also the real advantage, i.e. less solvent consumption and lower analysis time (5 min to determine the six species under study), have been verified.

The multielemental capability of the ICP-MS detector allowed the simultaneous determination of As and Se species and the suitable quantification of MMA. $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$ contribution on MMA peak area was assessed by using an experimental correction equation.

Finally, the developed method was validated, leading to satisfactory results for all the compounds in a complex matrix as influent and effluent water treatment plant.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was partially supported by Generalitat Valenciana through the research project GV05/120. ICP-MS measurements were made at the Servei Central d'Instrumentació Científica (SCIC), Universitat Jaume I.

REFERENCES

- [1] E. Terlecka, Environ. Monit. Assess. 107 (2005) 259.
- [2] C. B'Hymer, J.A. Caruso, J. Chromatogr. A 1045 (2004) 1.
- [3] C. B'Hymer, J.A. Caruso, J. Chromatogr. A 1114 (2006) 1.
- [4] X.C. Le, X. Lu, X.F. Li, Anal. Chem. 76 (2004) 26A.
- [5] Y. Martínez-Bravo, A.F. Roig-Navarro, F.J. López, F. Hernández, J. Chromatogr. A 926 (2001) 265.
- [6] A.F. Roig-Navarro, Y. Martínez-Bravo, F.J. López, F. Hernández, J. Chromatogr. A 912 (2001) 319.
- [7] T. Guerin, A. Astruc, M. Astruc, Talanta 50 (1999) 1.
- [8] K.L. Ackley, K.L. Sutton, J.A. Caruso, J. Anal. Atom. Spectrom. 15 (2000) 1069.
- [9] A. Seubert, Trends Anal. Chem. 20 (2001) 274.
- [10] J.L. Todolí, J.M. Mermet, Trends Anal. Chem. 24 (2005) 107.
- [11] H. Garraud, A. Woller, P. Fodor, O.F.X. Donard, Analysis 25 (1997) 25.
- [12] A.D. Jerkovich, J.S. Mellors, J.W. Jorgenson, LCGC Eur. 16 (2003) 20.
- [13] G. Rozing, M. Serwe, H.G. Weissgerber, B. Glatz, Am. Lab. 33 (2001) 26.
- [14] K.A. Oudhoff, T. Sangster, E. Thomas, I.D. Wilson, J. Chromatogr. B 832 (2006) 191.
- [15] H. Chassaigne, R. Lobinski, Fresenius J. Anal. Chem. 361 (1998) 267.
- [16] H. Emteborg, G. Bordin, A.R. Rodriguez, Analyst 123 (1998) 245.
- [17] J.L. Todolí, V. Hernandis, A. Canals, J.M. Mermet, J. Anal. Atom. Spectrom. 14 (1999) 1289.
- [18] Y.C. Sun, Y.S. Lee, T.L. Shiah, P.L. Lee, W.C. Tseng, M.H. Yang, J. Chromatogr. A 1005 (2003) 207.
- [19] G. Rozing, LCGC LC Column Technol. Suppl. (June 2004) 12.
- [20] A. Castillo, A.F. Roig-Navarro, O.J. Pozo, J. Chromatogr. A 1172 (2007) 179.
- [21] T. Guerin, M. Astruc, A. Batel, M. Borsier, Talanta 44 (1997) 2201.
- [22] L.S. Milstein, A. Essader, E.D. Pellizzari, R.A. Fernando, O. Akinbo, Environ. Int. 28 (2002) 277.
- [23] J.A. Day, M. Montes-Bayón, A.P. Vonderheide, J.A. Caruso, Anal. Bioanal. Chem. 373 (2002) 664.
- [24] S.A. Pergantis, E.M. Heithmar, T.A. Hinnert, Anal. Chem. 67 (1995) 4530.
- [25] A. Woller, H. Garraud, J. Boisson, A.M. Dorthe, P. Fodor, O.F.X. Donard, J. Anal. Atom. Spectrom. 13 (1998) 141.

- [26] K.E. Karlsson, M. Novotny, *Anal. Chem.* 60 (1988) 1662.
- [27] N.Wu, J.A. Lippert, M.L. Lee, *J. Chromatogr. A* 911 (2001) 1.
- [28] Zs. Stéfánka, G. Koellensperger, G. Stingeder, S. Hann, *J. Anal. Atom. Spectrom.* 21 (2006) 86.
- [29] J.W. Dolan, *LCGC Eur.* 14 (2001) 14.

2.4. APLICACIÓN DEL MÉTODO DE ESPECIACIÓN DESARROLLADO AL ESTUDIO DE LA PRESENCIA DE As Y Se EN EL ACUÍFERO DE LA PLANA DE CASTELLÓN

Una vez desarrollada la metodología analítica necesaria para la especiación de arsénico y selenio en aguas, se llevó a cabo la determinación de estos compuestos en diferentes localizaciones de la provincia de Castellón. Este trabajo se engloba dentro de un proyecto de investigación de la Generalitat Valenciana denominado "Estudio sobre la presencia de especies organometálicas en sectores seleccionados del acuífero de la Plana de Castellón" en colaboración con el grupo de Hidrogeología de la Universitat Jaume I. El objetivo final de dicho proyecto era confeccionar, por vez primera, un mapa de presencia de compuestos de As, Se, Cr, Hg y Sn del mencionado entorno. Este mapa, que puede variar en función del tiempo, debe recoger la información sobre la evolución de la concentración de las especies seleccionadas, lo cual debe permitir conocer la calidad del agua del acuífero.

El primer paso consistió en la elaboración de un plan de muestreo de pozos de riego y abastecimiento urbano, que abarcaron toda la zona sur seleccionada. Para ello, se tuvo que tener en cuenta que los últimos años han conllevado cambios en los usos del agua que han modificado completamente el funcionamiento de los pozos y la facilidad de acceso a los mismos. La mayoría de pozos tradicionalmente usados están parados y los que están en marcha, no lo están de manera continuada y son de acceso restringido, siendo de uso exclusivo de la comunidad de regantes. Respecto a los pozos de abastecimiento urbano pueden estar gestionados por los ayuntamientos o por FACSA, la empresa concesionaria para el abastecimiento del agua potable en muchos de los municipios de la zona seleccionada para el estudio. Así, se establecieron convenios de colaboración genéricos con las diferentes entidades públicas y privadas que nos han facilitado el acceso a las muestras de agua.

La campaña de muestreo se llevó a cabo durante el periodo comprendido entre Septiembre del 2007 a Enero del 2008 (ambos incluidos) en los siguientes municipios: Betxí, Nules, La Vilavella, Almenara, Xilxes, La Llosa y La Vall d'Uixó. La Tabla 2.1 recoge todos los pozos muestreados y la Figura 2.1 su situación en el mapa.

Tabla 2.1. Nombre de los pozos muestreados, identificación y municipio

	Agua de riego		Agua de abastecimiento urbano	
	Pozo	Etiqueta	Pozo	Etiqueta
La Vall d'Uixó	Rambleta 2	V1	Pipa	AV1
	Rambleta 7	V2	Anouret	AV2
	Corral Blanch	V3	La Zorra	AV3
	Montalar 1	V4	Belcaire	AV4
	Miranda E3	V5		
	Punta 2 E2 bis	V6		
	Randero 3	V7		
	Miramar D	V8		
	La Asunción	V9		
	Pla Pinar 3	V10		
	Cerverola 2	V11		
	Cerverola 3	V12		
	Maquial Casaña	V13		
	Maquial Pla Llobet	V14		
	Regeneración	V15		
	Primitiva	V16		
	Miramar	V17		
	Uxó	V18		
	Unión Agrícola 1	V19		
Xilxes	Sociedad Cristo	X1	Castellàs	AX1
	Regants Sèquia 1	X2	La Llosa Perforació	AX2
	Regants Sèquia 2	X3	La Llosa Caixa	AX3
Almenara	Salvador	A1		
	Sant josep	A2		
	C. Regants	A3		
	Talavera	A4		
	Caudal	A5		
	El Blau	A6		
	La sort	A7		
	El Consuelo	A8		
	La Rambleta	A9		
	Ullal (superficial)	A10		
Nules			Rambleta 1. Industrial	AN1
			Planta Ósmosis	AN2
Betxí			Ajuntament	AB1
			Espiritualidad	AB2
La Llosa	Font Rodona (superf.)	L1		
La Vilavella			Font Calda	AE1

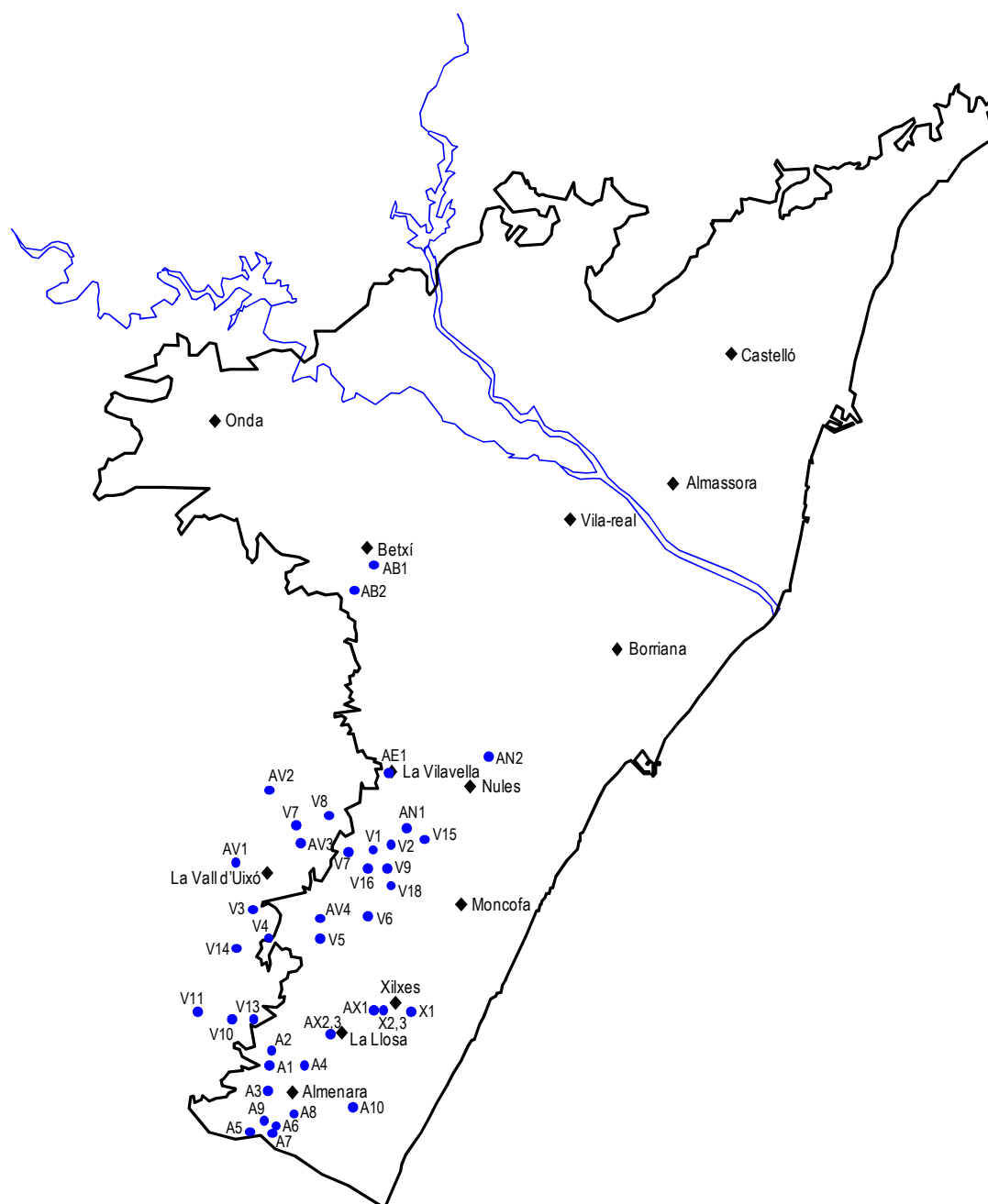


Figura 2.1. Plano de situación de los pozos muestreados del acuífero de la Plana de Castellón.

Las especies de arsénico y selenio determinadas en las aguas fueron As(III), DMA, MMA, As(V), Se(IV) y Se(VI). El método utilizado se describe detalladamente en el **artículo científico 2** y está basado en el acoplamiento microHPLC-ICP-MS, que proporciona la concentración de todos estos compuestos en un menor tiempo de análisis y reduciendo el consumo de disolventes. En la Tabla 2.2 se muestran los resultados correspondientes a los primeros análisis realizados.

Como se puede observar, en ninguna de las muestras se detectó la presencia de MMA ni DMA, tal y como cabía esperar para este tipo de aguas. Por lo que respecta a las especies inorgánicas de arsénico y selenio, en ninguna muestra se detectó una concentración que pueda considerarse tóxica. Así por ejemplo, sólo se encontró Se(IV) en concentraciones inferiores a 1 ppb en cinco muestras: A10, L1, V5, V11 y AE1. Una evaluación de los datos presentados, nos dice que la presencia de las especies metálicas estudiadas no alcanza valores que podamos considerar peligrosos de manera inmediata. Si tomamos como referencia los valores máximos para agua potable (aunque la mayoría son aguas destinadas al riego, sirve como nivel comparativo), ninguna muestra los supera. El resto de muestras y especies raramente se aproximan o superan el valor de 1 ppb de concentración. Esta primera evaluación nos indica que el fondo geoquímico para estas especies no es demasiado elevado.

A manera de resumen, se puede afirmar que las concentraciones encontradas de las especies de arsénico y selenio en las muestras analizadas son bajas y no suponen un peligro inmediato para la salud humana y la del medio ambiente. Sin embargo, hay que insistir en la necesidad de completar el estudio iniciado. Hay que muestrear más pozos para tener una representación de toda la parte meridional del acuífero (aún no se dispone de ninguna muestra de Moncofa, o de muestras de riego de Nules o Betxí, o de abastecimiento urbano de Almenara). Además, es necesaria la repetición de los controles en una época diferente (primavera) para conocer la evolución temporal de las concentraciones.

Una vez se disponga de toda la información (espacial y temporal) será factible elegir los puntos de muestreo más idóneos para la posible red de vigilancia, que habrá que completar con el análisis de otro tipo de muestras (aguas residuales, fangos...). En

cualquier caso, los resultados obtenidos dejan patente la idoneidad del acoplamiento microHPL-ICP-MS y su potencial en estudios de especiación medioambientales.

Tabla 2.2. Concentraciones encontradas de las especies de As y Se para las diferentes muestras de agua analizadas

Etiqueta	As(III)/ $\mu\text{g L}^{-1}$	DMA/ $\mu\text{g L}^{-1}$	MMA/ $\mu\text{g L}^{-1}$	As(V)/ $\mu\text{g L}^{-1}$	Se(IV)/ $\mu\text{g L}^{-1}$	Se(VI)/ $\mu\text{g L}^{-1}$
V1	nd	nd	nd	0.36	nd	nd
V2	nd	nd	nd	0.05	nd	nd
V3	nd	nd	nd	0.34	nd	0.39
V4	nd	nd	nd	0.07	nd	0.59
V5	0.20	nd	nd	nd	0.24	0.44
V6	nd	nd	nd	1.58	nd	0.13
V7	nd	nd	nd	0.16	nd	nd
V8	nd	nd	nd	0.38	nd	0.12
V9	nd	nd	nd	0.27	nd	nd
V10	nd	nd	nd	0.63	nd	0.13
V11	0.13	nd	nd	nd	0.14	0.40
V12	1.22	nd	nd	nd	nd	0.42
V13	0.09	nd	nd	0.10	nd	0.47
V14	0.08	nd	nd	0.12	nd	0.34
V15	0.18	nd	nd	0.10	nd	nd
V16	nd	nd	nd	nd	nd	0.04
V17	nd	nd	nd	0.41	nd	0.61
V18	0.06	nd	nd	0.24	nd	nd
V19	0.27	nd	nd	0.21	nd	nd
AV1	2.32	nd	nd	0.93	nd	nd
AV2	0.03	nd	nd	0.18	nd	0.15
AV3	nd	nd	nd	0.91	nd	0.05
AV4	0.01	nd	nd	0.05	nd	0.34
X1	nd	nd	nd	nd	nd	0.46
X2	nd	nd	nd	0.26	nd	0.28
X3	0.08	nd	nd	0.11	nd	0.14

Tabla 2.2. (continuación)

Etiqueta	As(III)/ $\mu\text{g L}^{-1}$	DMA/ $\mu\text{g L}^{-1}$	MMA/ $\mu\text{g L}^{-1}$	As(V)/ $\mu\text{g L}^{-1}$	Se(IV)/ $\mu\text{g L}^{-1}$	Se(VI)/ $\mu\text{g L}^{-1}$
AX1	nd	nd	nd	0.49	nd	0.24
AX2	nd	nd	nd	nd	nd	nd
AX3	nd	nd	nd	0.64	nd	0.53
A1	nd	nd	nd	0.29	nd	0.40
A2	nd	nd	nd	nd	nd	0.48
A3	nd	nd	nd	0.24	nd	0.68
A4	nd	nd	nd	nd	nd	0.46
A5	nd	nd	nd	0.10	nd	0.36
A6	0.12	nd	nd	nd	nd	0.83
A7	0.05	nd	nd	nd	nd	nd
A8	nd	nd	nd	0.22	nd	0.52
A9	nd	nd	nd	0.13	nd	0.69
A10	0.36	nd	nd	0.98	0.31	0.24
AN1	nd	nd	nd	0.13	nd	0.26
AN2	nd	nd	nd	0.16	nd	0.19
AB1	nd	nd	nd	0.12	nd	0.28
AB2	nd	nd	nd	0.12	nd	0.12
L1	0.13	nd	nd	1.15	0.69	0.08
AE1	0.09	nd	nd	1.47	0.48	0.46

2.5. DETERMINACIÓN DE As INORGÁNICO EN MUESTRAS ÁCIDAS

En el marco de una colaboración con el Instituto de Ciencias de la Tierra “Jaume Almera” (CSIC) se desarrolló un método de especiación basado en microHPLC-ICP-MS para determinar As(III) y As(V) en muestras de elevada acidez. Concretamente, la metodología desarrollada se aplicó al análisis de aguas ácidas de mina, cuyo alto contenido en arsénico hace indispensable su estudio para valorar el impacto que estos compuestos pueden ocasionar en el medio ambiente.

El drenaje de aguas ácidas de mina (AMD) es una de las principales causas de contaminación del agua a nivel mundial que se origina en zonas mineras que contienen sulfuros metálicos, caracterizándose por su bajo pH y alto contenido de metales y sulfatos.^{1,2} Estos lixiviados contienen concentraciones de arsénico de hasta cientos de mg L⁻¹, que superan en 5-6 órdenes de magnitud el valor máximo de 10 µg L⁻¹ establecido por la Unión Europea en 1998 para las aguas potables, los cuales se vierten en el curso del agua subterránea y superficial.³ Generalmente, el arsénico asociado a AMD está presente en diversas formas químicas que poseen diferente toxicidad y movilidad. La especiación de arsénico en este tipo de aguas incluye principalmente la determinación de los oxoaniones inorgánicos As(III) y As(V).^{4,5} La distribución en que se encuentran estas especies depende de parámetros como el pH, potencial redox, la presencia de otros compuestos en disolución y la actividad biológica.^{6,7} Así por ejemplo, el As(III) puede ser oxidado en presencia de luz por el Fe(III), elemento que se encuentra generalmente a elevadas concentraciones en el AMD.⁸ Una vez liberado, el impacto medioambiental del arsénico depende de su atenuación natural. Este proceso consiste básicamente en la adsorción del As(V) en los precipitados de oxihidróxidos e oxihidroxisulfatos de hierro que se forman en este tipo de medios, como la schwertmanita ($\text{Fe}_8\text{O}_8(\text{OH})_{5.5}(\text{SO}_4)_{1.25}$), la goethita (FeOOH) o la jarosita ($\text{KFe}_3(\text{SO}_4)_2(\text{OH})_6$) (Bigham et al., 1994; Fukushi et al., 2003; Acero et al., 2006).⁹⁻¹¹ Por lo tanto, para caracterizar debidamente los mecanismos dominantes que controlan la movilidad del arsénico en los drenajes ácidos resulta imprescindible determinar previamente la concentración de As(III) y As(V) que contienen.

Para este fin, se hizo uso nuevamente del acoplamiento microHPLC-ICP-MS. No obstante, en esta ocasión se optimizó un método de separación de As(III) y As(V) a pH

ácido en lugar de las condiciones básicas anteriormente utilizadas. De esta manera, se pretendió evitar la interconversión de especies y/o precipitación de compuestos metálicos presentes en la muestras de AMD que podría conllevar un drástico aumento de pH. En primer lugar, se estudió la separación de las especies inorgánicas de arsénico utilizando una fase móvil con 60 mM de NH_4NO_3 a pH 3. En estas condiciones el As(III), con un pK_a de 9.29, eluye en el volumen muerto con una correcta forma de pico. Sin embargo, la retención del As(V) en la columna cromatográfica no fue satisfactoria. Como se puede observar en la Figura 2.2, el As(V) originó dos picos con ensanchamiento severo. Este desdoblamiento se debe probablemente a la coexistencia de las formas H_3AsO_4 y H_2AsO_4^- del As(V) ($\text{pK}_{a1} = 2.24$), las cuales interaccionan con la fase estacionaria de intercambio aniónico de una forma marcadamente distinta.

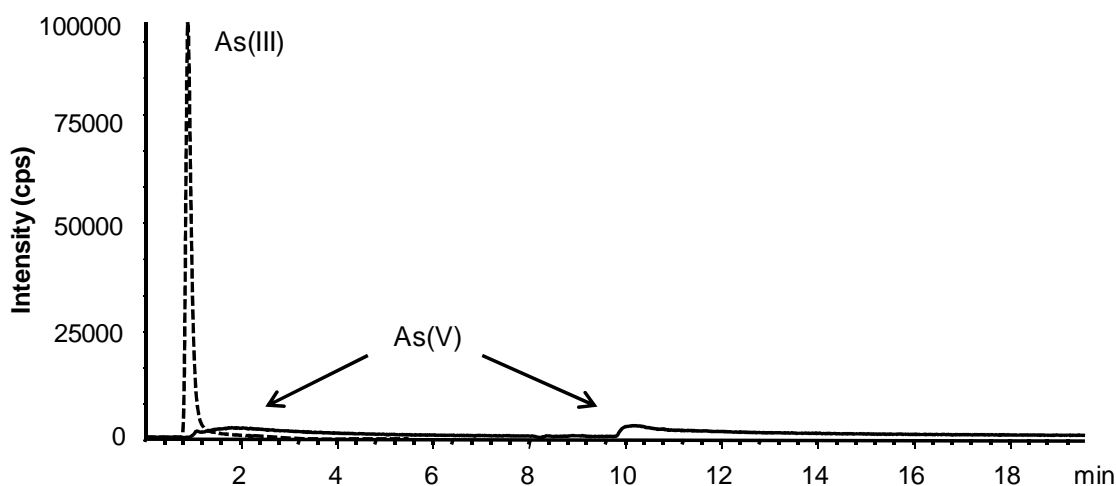


Figura 2.2. Superposición de los cromatogramas correspondientes a la inyección de $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de As(III) y As(V) utilizando 60 mM de NH_4NO_3 a pH 3 como eluyente.

De acuerdo con los trabajos precedentes, la adición de fosfato a la fase móvil proporciona una mejora significativa en la forma de pico del As(III) y As(V). Teniendo en cuenta esto, se evaluó el comportamiento cromatográfico de ambas especies utilizando una fase móvil basada en $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (pH 3). A diferencia del experimento anterior, en esta ocasión se consiguió eluir adecuadamente el As(V), aunque con un considerable solapamiento con el As(III). Por este motivo, se intentó mejorar la

resolución disminuyendo la fuerza eluotrópica y el flujo de la fase móvil. Las condiciones óptimas seleccionadas fueron 12 mM $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ a pH 3, un flujo cromatográfico de $80 \mu\text{L min}^{-1}$ y un volumen de inyección de muestra de $5 \mu\text{L}$.

Una vez desarrollado el método se procedió a la determinación del contenido de As(III) y As(V) en las muestras de AMD proporcionadas por el Instituto de Ciencias de la Tierra “Jaume Almera”. Debido a la elevada concentración de arsénico presente en este tipo de muestras, se diluyeron todas ellas 1:100 con fase móvil. En la Figura 2.3 se muestra como ejemplo el cromatograma resultante del análisis de una de las muestras, procedente de la descarga ácida de la mina abandonada de Tinto-Santa Rosa (Huelva). La cuantificación se llevó a cabo por calibración externa utilizando disoluciones patrón de 1, 5, 10, 25 y $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de As(III) y As(V) (expresado como As). Los límites de detección para ambas especies fueron $<0.05 \mu\text{g L}^{-1}$ y los coeficientes de correlación de alrededor de 0.999. En la Tabla 2.3 se recogen los resultados obtenidos.

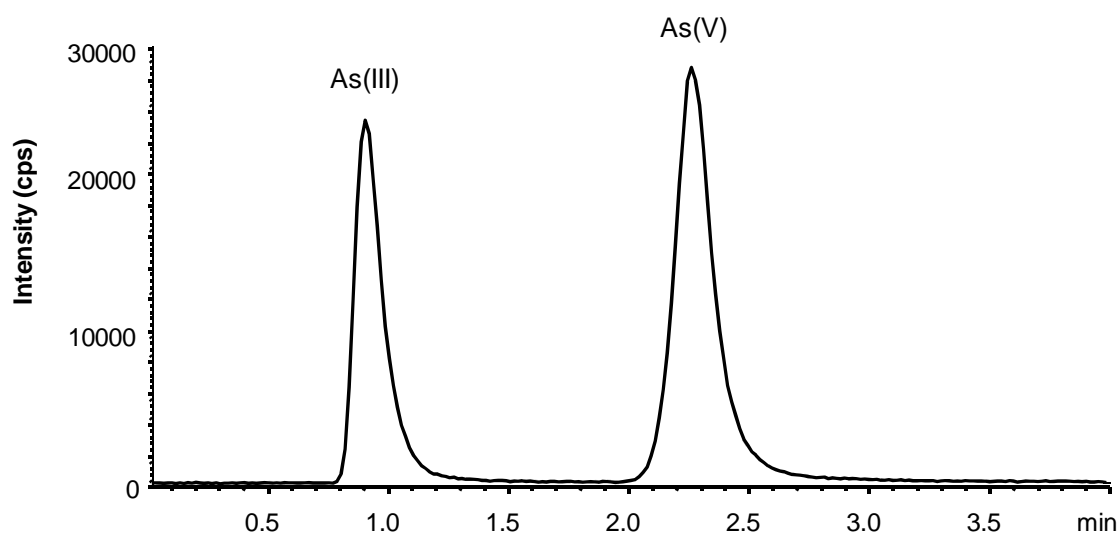


Figura 2.3. Determinación de As(III) y As(V) en una de las muestras de AMD (TS2) diluida 1:100 utilizando como fase móvil 12 mM $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ a pH 3.

Tabla 2.3. Concentraciones de As(III), As(V) y As total (AsT) encontradas en diferentes localizaciones de la descarga ácida de la mina Tinto-Santa Rosa

Muestra	As(III)/ $\mu\text{g L}^{-1}$	As(V)/ $\mu\text{g L}^{-1}$	AsT/ $\mu\text{g L}^{-1}$
TS1	608	1677	2285
TS2	1020	1498	2518
TS3	348	850	1198
TS4	290	781	1071
TS5	389	1008	1397
TS6	281	761	1042
TS7	285	653	938
TS8	207	470	677

2.5.1. Bibliografía

1. Kimball, B.A.; Runkel, R.L.; Walton-Day, K.; Bencala, K.E. *Assessment of metal loads in watersheds affected by acid mine drainage by using tracer injection and synoptic sampling: Cement Creek, Colorado, USA*. *Appl. Geochem.* **2002**, *17*, 1183–1207.
2. Yu, J.Y.; Heo, B.; Choi, I.K.; Cho, J.P.; Chang, H.W. *Apparent solubilities of schwertmannite and ferrihydrite in natural stream waters polluted by mine drainage*. *Geochim. Cosmochim. Acta* **1999**, *63* (19/20), 3407–3416.
3. Sainz, A.; Grande, J.A.; de la Torre, M.L.; Sánchez-Rodas, D. *Characterisation of sequential leachate discharges of mining waste rock dumps in the Tinto and Odiel rivers*. *J. Environ. Manag.* **2002**, *64*, 345–353.
4. Oliveira, V.; Sarmiento, A.M.; Gómez-Ariza, J.L.; Nieto, J.M.; Sánchez-Rodas, D. *New preservation method for inorganic arsenic speciation in acid mine drainage*. *Talanta* **2006**, *69*, 1182–1189.
5. Sánchez-Rodas, D.; Oliveira, V.; Sarmiento, A.M.; Gómez-Ariza, J.L.; Nieto, J.M. *Preservation procedures for arsenic speciation in a stream affected by acid mine drainage in southwestern Spain*. *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, *384*, 1594–1599.
6. Francesconi, K.A.; Kuehnelt, D. *Arsenic Compounds in the Environment*. In: Frankenberger, W.T. (Eds.), *Environmental Chemistry of Arsenic*. Marcel Dekker, New York, Basel, **2002**; pp. 51–94.
7. Fodor, P. *Arsenic speciation in the environment*. In: Ebdon, L.; Pitts, L.; Cornelis, R.; Crews, H.; Donard, O.F.X.; Quevauviller, Ph. (Eds.), *Trace Element Speciation for Environment, Food and Health*. Royal Society of Chemistry, Cambridge, **2001**; pp. 196–210.
8. Hug, S.; Canonica, L.; Wegelin, M.; Gechter, D.; Von Gunten, U. *Solar oxidation and removal of arsenic at circumneutral pH in iron containing waters*. *Environ. Sci. Technol.* **2001**, *35*, 2114–2121.

9. Acero, P.; Ayora, C.; Torrentó, C.; Nieto, J.M. *The role of trace elements during schwertmannite precipitation and subsequent transformation into goethite and jarosite*. *Geochim. Cosmochim. Acta* **2006**, 70, 4130-4139.
10. Fukushi, K.; Sasaki, M.; Sato, T.; Yanese, N.; Amano, H.; Ikeda, H. *A natural attenuation of arsenic in drainage from an abandoned arsenic mine dump*. *Appl. Geochem.* **2003**, 18, 1267–1278.
11. Bigham, J.M.; Carlson, L.; Murad, E. *Schwertmannite, a new iron oxyhydroxysulphate from Pyhasalmi, Finland, and other localities*. *Miner. Magazine* **1994**, 58, 641–648.

2.6. ESPECIACIÓN DE As EN ORINA HUMANA BASADA EN PSEUDO-DILUCIÓN ISOTÓPICA INESPECÍFICA MEDIANTE EL USO DE Ge COMO PATRÓN INTERNO

La exposición al arsénico es un problema en expansión en todo el mundo.¹ En el cuerpo humano se encuentra principalmente en forma de As(III), As(V), MMA, DMA y AsB, aunque puede variar en función del entorno medioambiental y de la dieta. Para la evaluación de esta exposición, la orina se considera uno de los biomarcadores más importantes.² Debido a que estos compuestos poseen diferente grado de toxicidad es necesario determinarlos separadamente, con el fin de evaluar adecuadamente el riesgo potencial que pueden causar en el organismo. En este sentido, el acoplamiento HPLC-ICP-MS es la técnica ideal para realizar la especiación de arsénico en orina.³⁻⁷ Sin embargo, la elevada concentración de sales que contiene provoca deriva de la señal y efectos matriz, lo que dificulta enormemente el análisis.⁸

El análisis por dilución isotópica inespecífica permite corregir todos esos problemas, proporcionando determinaciones exactas y precisas del elemento de interés.⁹ Esta técnica consiste en la adición de un elemento enriquecido isotópicamente a la muestra después de que tenga lugar la separación cromatográfica de las diferentes especies, con abundancia isotópica natural, que están presentes en la misma. Puesto que la eficiencia de ionización del ICP-MS es independiente de la forma química del elemento, la medida de la relación isotópica en todo el cromatograma proporciona la concentración corregida de cada uno de los compuestos eluidos. En otras palabras, los picos del cromatograma de flujo másico, que no están afectados por la inestabilidad de la señal, son integrados y normalizados al volumen de inyección. En el caso del arsénico, al disponer de un solo isótopo estable (m/z 75), no es posible utilizar un patrón marcado isotópicamente, así que se debe seleccionar un patrón interno de un elemento con una masa y potencial de ionización lo más similares posibles. El selenio parece ser el mejor candidato para este fin;^{10,11} sin embargo, frecuentemente se encuentra en muestras de orina, lo que puede inducir errores en la determinación. Por el contrario, el germanio raras veces está

presente en la orina y ha sido utilizado satisfactoriamente en calibración interna para la corrección del efecto matriz del As.^{12,13}

En el presente trabajo se ha seleccionado el isótopo ⁷²Ge como patrón interno para llevar a cabo la especiación de arsénico. Como ambos elementos poseen diferentes potenciales de ionización y en consecuencia diferente respuesta en el ICP-MS, se normalizó la concentración de germanio a arsénico introduciendo una cantidad conocida de este último elemento a la disolución de patrón interno añadida post-columna. De esta forma, se pudo utilizar la m/z 72 como un isótopo adicional del As. Este procedimiento, al que se ha denominado "análisis por pseudo-dilución isotópica inespecífica", hace posible obtener la concentración corregida de los diferentes compuestos de arsénico en orina sin hacer uso de curva de calibrado. En efecto, basándonos en el desarrollo matemático detallado en el capítulo 1 para la dilución isotópica inespecífica, podemos deducir una expresión análoga que permita calcular la cantidad de As contenido en cada pico cromatográfico:

$$MF_s = C_{IS}^{As} d_{IS} f_{IS} \cdot \left(\frac{R_m}{R_{IS}} - 1 \right) \quad (2)$$

donde MF_s es el flujo másico de la muestra (ng As min^{-1}) que eluye de la columna, C_{IS}^{As} la concentración másica de As en la disolución de patrón interno (mol L^{-1}) de densidad d_{IS} (g mL^{-1}), que se bombea a un flujo f_{IS} (mL min^{-1}). R_m y R_{IS} indican la relación isotópica experimental (⁷⁵As/⁷²Ge) en la mezcla y en la disolución de patrón interno, respectivamente.

El método se validó satisfactoriamente para muestras de orina humana fortificadas a 1, 5 y 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ As y para una muestra de orina no fortificada con diferentes concentraciones de las especies de As. Además, los resultados coincidieron con los obtenidos utilizando calibración interna y adiciones estándar. La precisión se estimó analizando réplicas del nivel medio de fortificación ($n = 9$) en 3 días diferentes, dando coeficientes de variación menores del 8%. En cuanto a los límites de detección, la adición continua de As a través de la disolución de patrón interno provocó un incremento notable de los mismos (LODs $\sim 0.7 \mu\text{g L}^{-1}$ As en la orina diluida 1:5 inyectada). En todo caso, estos valores son lo suficientemente bajos como para poder

evaluar el riesgo potencial de la población expuesta al arsénico inorgánico en el entorno laboral, a través de la alimentación o del agua potable. Cabe resaltar que el procedimiento desarrollado permite cuantificar las diferentes especies de As en una única inyección, lo que lo convierte en una prometedora alternativa a los métodos de calibración convencionales.

Por otro lado, se examinó la capacidad de la metodología propuesta para corregir la deriva instrumental realizando sucesivas inyecciones de una muestra de orina durante un periodo de 15 h. Cuando se midió el área de pico correspondiente a los cromatogramas correspondientes a m/z 75, se obtuvieron áreas de pico considerablemente menores para las últimas inyecciones, como consecuencia de la pérdida de sensibilidad. Sin embargo, el uso de pseudo-dilución isotópica inespecífica condujo a los mismos resultados, poniendo de manifiesto el potencial de esta técnica en el análisis de matrices complejas.

2.6.1. Bibliografía

1. Komorowicz, I; Baralkiewicz, D. *Arsenic and its speciation in water samples by high performance liquid chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry–Last decade review*. *Talanta* **2011**, 84, 247-261.
2. Morton, J.; Leese, E. *Arsenic speciation in clinical samples: urine analysis using fast micro-liquid chromatography ICP-MS*. *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, 399, 1781-1788.
3. Morton, J.; Leese, E. *Arsenic speciation in clinical samples: urine analysis using fast micro-liquid chromatography ICP-MS*. *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, 399, 1781-1788.
4. Davis, W.C.; Zeisler, R.; Sieber, J.R.; Yu, L.L. *Methods for the separation and quantification of arsenic species in SRM 2669: arsenic species in frozen human urine*. *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, 396, 3041-3050.
5. Bélanger, P.; Dumas, P. *Fast determination of urine arsenic species by ion exchange chromatography and HPLC-ICP-MS using collision-reactive interface*. *Atom. Spectrosc.* **2010**, 31, 175-181.
6. Wangn, R.Y.; Hsu, Y.L.; Chang, L.F.; Jiang, S.J. *Speciation analysis of arsenic and selenium compounds in environmental and biological samples by ion chromatography-inductively coupled plasma dynamic reaction cell mass spectrometer*. *Anal. Chim. Acta* **2007**, 590, 239-244.
7. Pan, F.; Tyson, J.F.; Uden, P.C. *Simultaneous speciation of arsenic and selenium in human urine by high-performance liquid chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry*. *J. Anal. At. Spectrom.* **2007**, 22, 931-937.
8. Verdon, C.P.; Caldwell, K.L.; M. Fresquez, M.R.; Jones, R.L. *Determination of seven arsenic compounds in urine by HPLC-ICP-DRC-MS: a CDC population biomonitoring method*. *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, 393, 939-947.
9. Hinojosa Reyes, L.; Marchante-Gayón, J.M.; García Alonso, J.I.; Sanz-Medel, A. *Quantitative speciation of selenium in human serum by affinity chromatography coupled to post-column isotope dilution analysis ICP-MS*. *J. Anal. At. Spectrom.* **2003**, 18, 1210-1216.

10. Nam, S.H.; Oh, H.J.; Min, H.S.; Lee, J.H. *A study on the extraction and quantification of total arsenic and arsenic species in seafood by HPLC-ICP-MS*. *Microchem. J.* **2010**, *95*, 20-24.
11. Serapinas, P.; Labarraque, G.; Charlet, P.; Ezerinskas, Z.; Juzikiene, V. *Method of standard additions for arsenic measurements in water by ICP sector field mass spectrometry at accuracy comparable to isotope dilution*. *J. Anal. At. Spectrom.* **2010**, *25*, 624-630.
12. Rodriguez, I.B.; Francesconi, K.A.; Goessler, W. *A rapid method for the determination of total arsenic in biological digests and aqueous extracts by flow injection inductively coupled plasma mass spectrometry*. *J. Anal. At. Spectrom.* **2008**, *23*, 235-239.
13. Amarasiriwardena, C.J.; Lupoli, N.; Potula, V.; Korrick, S.; Hu, H. *Determination of the total arsenic concentration in human urine by inductively coupled plasma mass spectrometry: a comparison of the accuracy of three analytical methods*. *Analyst* **1998**, *123*, 441-445.

2.6.2. Artículo científico 3

“Rapid screening of arsenic species in urine from exposed human by inductively coupled plasma mass spectrometry with germanium as an internal standard”

A. Castillo, C. Boix, N. Fabregat, A.F. Roig-Navarro and J.A. Rodríguez-Castrillón.

Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 27 (2012) 354–358.

JAAS

[View Online / Journal Homepage / Table of Contents for this issue](#)
[Dynamic Article Links](#)

Cite this: *J. Anal. At. Spectrom.*, 2012, **27**, 354

www.rsc.org/jaas

TECHNICAL NOTE

Rapid screening of arsenic species in urine from exposed human by inductively coupled plasma mass spectrometry with germanium as internal standard

A. Castillo,^a C. Boix,^a N. Fabregat,^a A. F. Roig-Navarro^{a*} and J. A. Rodríguez-Castrillón^b

Received 28th September 2011, Accepted 1st November 2011
DOI: 10.1039/c1ja10289c

In the present work, internal standardization based on species-unspecific isotope dilution analysis technique is proposed in order to overcome the matrix effects and signal drift originated in the speciation of As in urine by HPLC-ICP-MS. To this end, ⁷⁶Ge has been selected as a pseudo-isotope of As. The resulting mass flow chromatogram of the element allows the calculation of the corrected overall species concentrations without requiring any methodological calibration, providing high-throughput sample processing. The validation was carried out by analyzing a blank human urine fortified at three concentration levels and an unspiked human urine sample containing different species of arsenic. In all cases, recoveries ranging from 90 to 115% and RSD below 10% were attained with this approach. Furthermore, the proposed method provided results in excellent agreement with those obtained using standard additions and internal standard calibration, allowing a fast way to assess human exposure to arsenic species.

1. Introduction

It is widely known that potential health risk to arsenic exposition depends on the chemical form entering the human body, due to the different degree of toxicity of these compounds.^{1–4} Urine is regarded as an important biomarker of arsenic intake. In this regard, a speciation analysis of urine is usually performed by HPLC-ICP-MS.^{5–10} However, signal drift and matrix effects are observed due to urine matrix, hampering the quantification of such species.¹¹

The use of species unspecific isotope dilution analysis allows the correction for those errors, providing accurate and precise determinations of the sought element. In the case of arsenic, there is only one isotope available to be measured (*m/z* 75); therefore, an internal standard of an element close to the analyte mass has to be selected to follow the isotope dilution procedure.¹² This approach, which we have called “pseudo-unspecific isotope dilution analysis”, could make it possible to obtain the accurate concentrations of the above mentioned species in a single run.

The developed method was applied for the analysis of human urine samples fortified at different concentration levels and compared with internal calibration and the standard additions method.

2. Experimental

2.1. Instrumentation

The HPLC system consisted of an Agilent 1100 Series (Agilent, Waldbronn, Germany) binary pump and auto injector with a programmable sample loop (100 µL maximum). The separations were performed on a PRP-X100 (Hamilton, Reno, NV, USA) anion-exchange column (250 × 4.1 mm, 10 µm). An additional Agilent 1100 Series binary pump was used to continuously add the internal standard solution.

The outlet of the chromatographic column was connected through a T piece to a Meinhard concentric nebulizer. An Agilent 7500cx inductively coupled plasma mass spectrometer (Agilent Technologies, Tokyo, Japan) equipped with an octopole reaction cell using helium as a reaction gas to reduce polyatomic interferences on arsenic was used in this work. For HPLC-ICP-MS data acquisition, the “time resolved analysis” mode was used with 1 s of integration time per mass.

For tuning of ICP-MS, a solution containing 10 µg L⁻¹ of As made up in double deionized water filtered through 0.45 µm was monitored at *m/z* 75 and 72; the ion intensity, resolution and mass axis were optimized.

2.2. Standards and reagents

Arsenite (As^{III}), arsenate (As^V), dimethylarsinic acid (DMA) and arsenobetaine form (AsB) were delivered by Floka (Buchs, Switzerland), while monomethylarsonic acid (MMA) was from Carlo Erba (Milano, Italy). The stock solutions of arsenic species containing about 1000 mg L⁻¹ of As were prepared in water and maintained at 4 °C after standardization against an atomic

^aResearch Institute for Pesticides and Water, Universitat Jaume I, E-12071 Castelló, Spain. E-mail: roig@qfaj.uji.es; Fax: +34 964 387368; Tel: +34 964 387359

^bInnovative Solutions in Chemistry S.L., Edificio Científico-Tecnológico Campus de “El Cristo”, Oviedo, Spain

JOURNAL OF ANALYTICAL ATOMIC SPECTROMETRY

J. Anal. At. Spectrom., 27 (2012) 354–358

Received: 28 September 2011; Accepted: 1 November 2011; Published online: in ScienceDirect
(www.sciencedirect.com) DOI: 10.1039/c1ja10289c

Rapid screening of arsenic species in urine from exposed human by inductively coupled plasma mass spectrometry with germanium as an internal standard

A. Castillo, C. Boix, N. Fabregat, A.F. Roig-Navarro and J.A. Rodríguez-Castrillón¹

Research Institute for Pesticides and Water, Universitat Jaume I, E-12071 Castelló, Spain

¹Innovative Solutions in Chemistry S.L., Edificio Científico-Tecnológico Campus de "El Cristo", Oviedo, Spain

ABSTRACT

In the present work, internal standardization based on species-unspecific isotope dilution analysis technique is proposed in order to overcome the matrix effects and signal drift originated in the speciation of As in urine by HPLC-ICP-MS. To this end, ⁷²Ge has been selected as a pseudo-isotope of As. The resulting mass flow chromatogram of the element allows the calculation of the corrected overall species concentrations without requiring any methodological calibration, providing high-throughput sample processing. The validation was carried out by analyzing a blank human urine fortified at three concentration levels and an unspiked human urine sample containing different species of arsenic. In all cases, recoveries ranging from 90 to 115% and RSD below 10% were attained with this approach. Furthermore, the proposed method provided results in excellent agreement with those obtained using standard additions and internal standard calibration.

1. INTRODUCTION

It is widely known that potential health risk to arsenic exposition depends on the chemical form entering the human body, due to the different degree of toxicity of these compounds.¹⁻⁴ Urine is regarded as an important biomarker of arsenic intake. In this sense, a speciation analysis of urine is usually performed by HPLC-ICP-MS.⁵⁻¹⁰ However, signal drift and matrix effects are observed due to urine matrix, hampering the quantification of such species.¹¹

The use of species-unspecific isotope dilution analysis allows the correction for those errors, providing accurate and precise determinations of the sought element. In the case of arsenic, there is only one isotope available to be measured (m/z 75); therefore, an internal standard of an element close to the analyte mass has to be selected to follow the isotope dilution procedure.¹² This approach, which we have called "pseudo-unspecific isotope dilution analysis", could make possible to obtain the accurate concentrations of the above mentioned species in a single run.

The developed method was applied for the analysis of human urine samples fortified at different concentration levels and compared with internal calibration and the standard additions method.

2. EXPERIMENTAL

2.1. Instrumentation

The HPLC system consisted of an Agilent 1100 Series (Agilent, Waldbronn, Germany) binary pump and auto injector with a programmable sample loop (100 μ L maximum). The separations were performed on a PRP-X100 (Hamilton, Reno, NV, USA) anion-exchange column (250 x 4.1 mm, 10 μ m). An additional Agilent 1100 Series binary pump was used to continuously add the internal standard solution.

The outlet of the chromatographic column was connected through a T piece to a Meinhard concentric nebulizer. An Agilent 7500cx inductively coupled plasma mass spectrometer (Agilent Technologies, Tokyo, Japan) equipped with an octopole reaction cell using helium as a reaction gas to reduce polyatomic interferences on arsenic was used in this work. For HPLC-ICP-MS data acquisition, the "time resolved analysis" mode was used with 1 second of integration time per mass.

For tuning of ICP-MS, a solution containing 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ of As made up in double deionized water filtered through 0.45 μm was monitored at m/z 75 and 72; the ion intensity was optimized. Then, resolution and mass axis were also optimized.

2.2. Standards and reagents

Arsenite (As^{III}), arsenate (As^{V}), dimethylarsinic acid (DMA) and arsenobetaine form (AsB) were delivered by Fluka (Buchs, Switzerland), while monomethylarsonic acid (MMA) was from Carlo Erba (Milano, Italy). The stock solutions of arsenic species containing about 1000 mg L^{-1} As were prepared in water and maintained at 4 $^{\circ}\text{C}$ after standardization against an atomic absorption arsenic standard solution (J.T. Baker, Phillipsburg, USA).¹³ Appropriate dilutions of the stock solution were prepared daily, by weight, using double deionized water to obtain the required concentration. Germanium internal standard and nitric acid was purchased from Fluka.

A previously developed method⁵ based on HPLC-ICP-MS coupling system was optimized in order to separate the five arsenic species in human urine. The mobile phase consisted of 4 mM ammonium phosphate (Merk, Darmstad, Germany), 4 mM ammonium hydrogen carbonate (Fluka) and 4 mM ammonium sulfate (Sigma, St. Louis, MO, USA). The pH value was adjusted to 8.9 by the addition of ammonium hydroxide (Trace Select, Fluka). These solutions were filtered through a 0.45 μm membrane before use.

All the aqueous solutions were prepared with Milli Q Gradient A10 (Millipore, Molsheim, France) water (18.2 $\text{M}\Omega\text{ cm}$).

2.3. Analytical procedure

Urine samples were diluted 5 fold with 0.1 % nitric acid and were filtered through 0.45 μm nylon membrane before injection. The flow coming from the column (0.95 mL min^{-1}) was mixed with the internal standard solution containing around 15 ng g^{-1} of Ge and 4 ng g^{-1} of As (0.15 mL min^{-1}). The signals for m/z 75 and 72 were monitored with time. After smoothing of the data using moving average ($n = 5$) in order to reduce noise level the isotope ratio $^{75}\text{As}/^{72}\text{Ge}$ was calculated. Then, the on-line pseudo-isotope dilution equation was applied to each point of the chromatogram to obtain the mass flow chromatogram. The amount of arsenic in each fraction was determined by integration of the chromatographic peaks using the Origin 5.0 software (Microcal Software Inc., Northampton, MA, USA). Finally, the concentration of arsenic was computed by dividing the As amount found by the injection volume.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Selection of internal standard and development of the equation for on-line pseudo-isotope dilution analysis

In order to appropriately correct for matrix-induced signal enhancement or suppression as well as for drift instability of the instrument the analyte and the internal standard should undergo an equal relative signal intensity drift. To this end, mass-to-charge ratio and ionization potential of both elements should be as close as possible, the first factor being especially critical. In this regard, selenium seems the best candidate to use as an internal standard to arsenic speciation.^{12–14} However, this element is often present in urine samples, which can produce errors in the normalization. By contrast, germanium is rarely present in urine samples and has been satisfactory used for matrix effects correction.¹⁵ As a consequence, the isotope ^{72}Ge was selected as an internal standard.

The proposed procedure is based on post-column isotope dilution analysis.¹⁶ Briefly, this technique consists in the on-line addition of an isotopically enriched solution of the sought element after the chromatography separation to modify the original isotope abundances in the sample. The resulting isotope ratio of the most abundance isotope in the sample and the spike permits to calculate the endogenous concentration contained in each chromatographic peak. In the case of arsenic, a germanium internal standard is used instead of a spike, owing to its monoisotopic character. Since both elements have different ionization efficiencies, the experimental isotope ratio in the mixture R_m ($^{75}\text{As}/^{72}\text{Ge}$) will not provide the As/Ge molar ratio. The instrumental response of Ge present in the mixture must be previously normalized to As in order to correlate R_m with the analyte concentration. For this purpose, a known amount of As was added within the internal standard solution and the corresponding isotope ratio R_{IS} ($^{75}\text{As}/^{72}\text{Ge}$) was measured. Consequently, R_m and R_{IS} can be expressed as follows:

$$R_m = \frac{N_s^{As} d_s f_s + N_{IS}^{As} d_{IS} f_{IS}}{N_{IS}^{Ge} d_{IS} f_{IS}} \quad (1)$$

$$R_{IS} = \frac{N_{IS}^{As}}{N_{IS}^{Ge}} \quad (2)$$

where N_s^{As} (mol g⁻¹) shows the amount of As in the sample with density d_s (g mL⁻¹) pumped at a flow rate f_s (mL min⁻¹), which is mixed with N_{IS}^{As} (mol g⁻¹) of As arising from the internal standard solution pumped at a flow rate f_{IS} (mL min⁻¹) and density d_{IS} (g mL⁻¹). The term N_{IS}^{Ge} (mol g⁻¹) is the

concentration of Ge normalized to As, which must not be confused with the true amount of Ge. Indeed, $N_{IS}^{Ge'}$ would represent the mol g⁻¹ of ⁷²Ge contained in the internal standard solution if the ionization efficiency were the same as As. When we combine eqns. (1) and (2) the following expression is obtained:

$$R_m = \frac{N_s^{As} d_s f_s + N_{IS}^{As} d_{IS} f_{IS}}{(N_{IS}^{As}/R_{IS}) d_{IS} f_{IS}} \quad (3)$$

Please note that the true amount of Ge is not needed in the calculation. Rearranging eqn. (3) for N_s^{As} , we obtain:

$$N_s^{As} d_s f_s = N_{IS}^{As} d_{IS} f_{IS} \left(\frac{R_m}{R_{IS}} - 1 \right) \quad (4)$$

Concentrations in mol g⁻¹ can be expressed as concentrations in weight by taking into account the atomic weight of the element. Since the atomic weight of As in the sample (AW_s^{As}) and in the internal standard solution (AW_{IS}^{As}) are the same, eqn. (4) becomes:

$$C_s^{As} d_s f_s = C_{IS}^{As} d_{IS} f_{IS} \left(\frac{R_m}{R_{IS}} - 1 \right) \quad (5)$$

where C_s^{As} and C_{IS}^{As} are the mass concentrations (ng g⁻¹) of As in the sample and internal standard solution, respectively. $C_s^{As} d_s f_s$ has the units of ng min⁻¹ and it is the mass flow of the sample eluting from the column, MF_s . Then, the final pseudo-isotope dilution equation has the form:

$$MF_s = C_{IS}^{As} d_{IS} f_{IS} \left(\frac{R_m}{R_{IS}} - 1 \right) \quad (6)$$

If the analyte concentration changes with time, e.g., during the chromatographic peak, MF_s will also change with time. The integration of the chromatographic peak in the mass flow chromatogram will give the amount of As in that fraction. The concentration is then easily calculated knowing the sample volume injected. Eqn. (6) was thus used for calculations in the present work.

3.2. Analytical results

In a preliminary study, the concentration of the As primary standard in the internal standard solution was optimized. On the one hand, it has to be taken into account that a high enough amount of exogenous As is required to minimize the m/z 75 background influence. On the other hand, the increasing ^{75}As signal coming from the post-column solution the higher baseline noise, leading to poorer detection limits of the endogenous species. Thereby, a concentration of ca. 4 ng g^{-1} was selected as a compromise. The case of Ge internal standard concentration is much less critical because it does not contribute to the signal of the analyte eluting from the column and does not influence the final results. In addition, the chromatographic and post-column flow rates were tested. The final values used for the mobile phase and the internal standard solution (0.95 and 0.15 mL min^{-1} , respectively) allowed the elution of the overall species in a proper time without sacrificing the accuracy of the post-column flow rate.

To a better understanding of the procedure, Fig. 1 illustrates the conversion from original ICP-MS intensities to mass flow. The chromatograms corresponding to m/z 75 and 72 (a) are first transformed into the isotope ratio chromatogram (b). It is worth stressing that ^{75}As and ^{72}Ge background signal from mobile phase was negligible (data not shown), thus the baseline of the isotope ratio chromatogram provides R_S (see Fig. 1b). Next, eqn. (6) is applied to the whole chromatogram. Finally, the mass flow peaks of Fig. c are integrated and divided by the injection volume ($50 \mu\text{L}$). It should be remarked that the present strategy permits to correct for errors derived from instrumental instabilities and matrix effects in the whole chromatogram, since the Ge internal standard is continuously added to the effluent from the column.

The proposed procedure was applied to the analysis of a blank urine sample spiked at 1, 5 and $10 \mu\text{g As L}^{-1}$ (concentrations referred to the diluted urine injected). It is worth noting that the blank urine used corresponds to an unexposed human and no As species were found when it was analyzed by the conventional calibration method. Ten replicates for every one of the three fortification levels were carried out. Additionally, in order to check the suitability of ^{72}Ge as internal standard the results were compared with those obtained using internal standard calibration. To this end, calibration standards containing $0\text{--}20 \mu\text{g As L}^{-1}$ of each compound were injected by triplicate within the post-column solution. Then, the isotope ratio chromatogram was plotted (as exemplify in Fig. 1b). Satisfactory recoveries, between 90 to 105%, were obtained both for the medium and highest fortification levels when pseudo-unspecific IDA was used. At the lowest fortification level, which was closed to the detection limit, recoveries were in the range of 96–115% and coefficients of variation were below 10% (Table 1). No significant differences were noticed between both methods, thus it seems that calibration-free measurements based on eqn. (6) can be performed for the quantification of As species in urine.

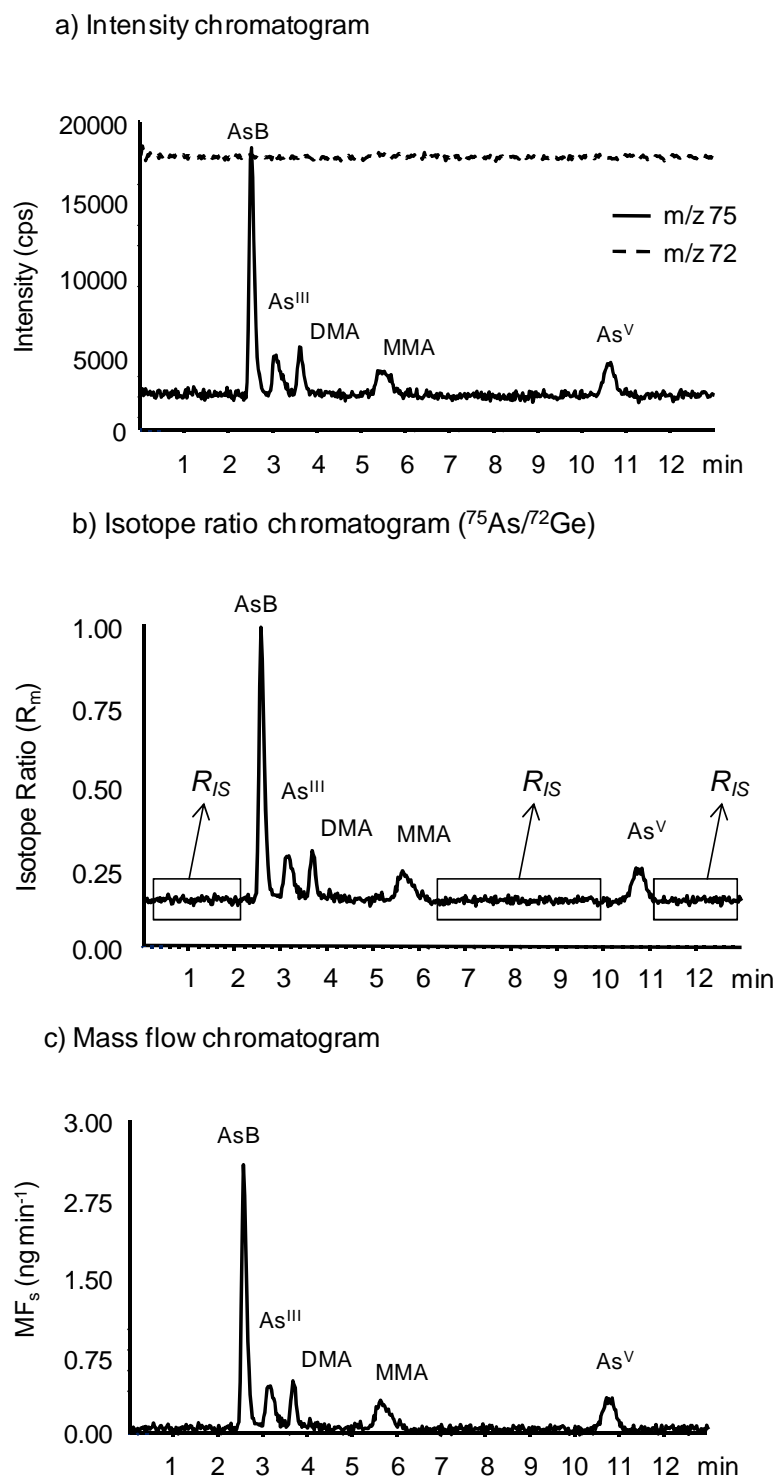


Figure 1. Conversion process from intensities to mass flow using the pseudo-isotope dilution equation.

Table 1. Analytical characteristics of the pseudo-unspecific IDA procedure obtained for a blank urine sample fortified at three different levels

Species	1 $\mu\text{g As L}^{-1}$		5 $\mu\text{g As L}^{-1}$		10 $\mu\text{g As L}^{-1}$		Intermediate precision. 5 $\mu\text{g As L}^{-1}$ C.V. (%) (n=9)	LOD ^c ($\mu\text{g L}^{-1}$)
	Pseudo-IDA	IC ^b	Pseudo-IDA	IC	Pseudo-IDA	IC		
AsB	96.8 (8.7) ^a	104.6 (10.0)	90.8 (1.8)	99.4 (1.5)	92.1 (2.2)	101.3 (0.9)	6.2	0.3
As ^{III}	99.5 (5.9)	111.0 (4.0)	100.7 (7.4)	106.5 (5.1)	101.1 (4.9)	104.8 (0.9)	7.4	0.6
DMA	102.0 (6.3)	106.5 (3.5)	97.5 (9.5)	94.3 (6.9)	100.0 (2.3)	94.4 (1.6)	3.5	0.3
MMA	114.6 (1.7)	115.6 (2.4)	101.1 (9.2)	101.8 (6.8)	102.6 (3.0)	101.6 (3.3)	5.5	0.4
As ^V	104.0 (3.6)	104.2 (5.4)	95.7 (6.6)	103.1 (6.8)	96.5 (1.1)	103.1 (0.4)	3.8	0.7

^a The uncertainty in the values corresponds to 1 s standard deviation of 10 independent HPLC-ICP-MS injections.^b Recoveries calculated using internal standard calibration, for comparison.^c Detection limits referred to diluted urine sample.

Intermediate precision ($n = 9$) was also estimated by analyzing replicates of the medium fortification level on 3 different days. The coefficient of variation was found to be $<8\%$ in all cases. Detection limits, defined as three times the signal-to-noise ratio in the mass flow chromatogram were determined for the blank urine sample spiked at $1 \mu\text{g L}^{-1}$ of each As species. As can be seen in Table 1, LODs were $<0.7 \mu\text{g L}^{-1}$ in the diluted urine. In fact, the continuous addition of arsenic post-column to normalize de germanium response increase notably the detection limits. However, these values are satisfactory to evaluate the potential risk of people exposed to inorganic arsenic. Actually, the American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH) and Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) set the BEI and BAT values for occupational arsenic exposure as $35 \mu\text{g As L}^{-1}$ and $50 \mu\text{g L}^{-1}$, using the sum of inorganic arsenic, MMA and DMA.¹⁷

The validity of the proposed method for correcting instrument signal drift was tested with the injection of a 15 h batch run. Fig. 2a compares the intensity chromatograms corresponding to the first and last injections of the experiment. Appreciable signal drift was observed between them, resulting in lower peak areas for the second injection. The application of eqn. (6) lead to the mass flow chromatograms presented in Fig. 2b. As expected, no significant differences were noticed between injections, which confirms that appropriate correction of signal drift is achieved. It is worth mentioning the severe signal suppression at the dead volume caused by the high salt content of urine sample (Fig. 2a). In this case, instrumental instability was not totally overcome (Fig. 2b), most probably because the Ge internal standard suffers more signal depression than As in the presence of high concentration of Na. Anyway, such anomalous behavior does not affect any chromatographic peak.

Finally, the quantification of a human urine sample containing different species of arsenic was performed by the present methodology, internal standard calibration and standard additions (Table 2). The concentrations calculated by pseudo-unspecific IDA were in very good agreement with those obtained using the other quantification strategies. These data confirm the suitability of the developed procedure for arsenic speciation studies in human urine.

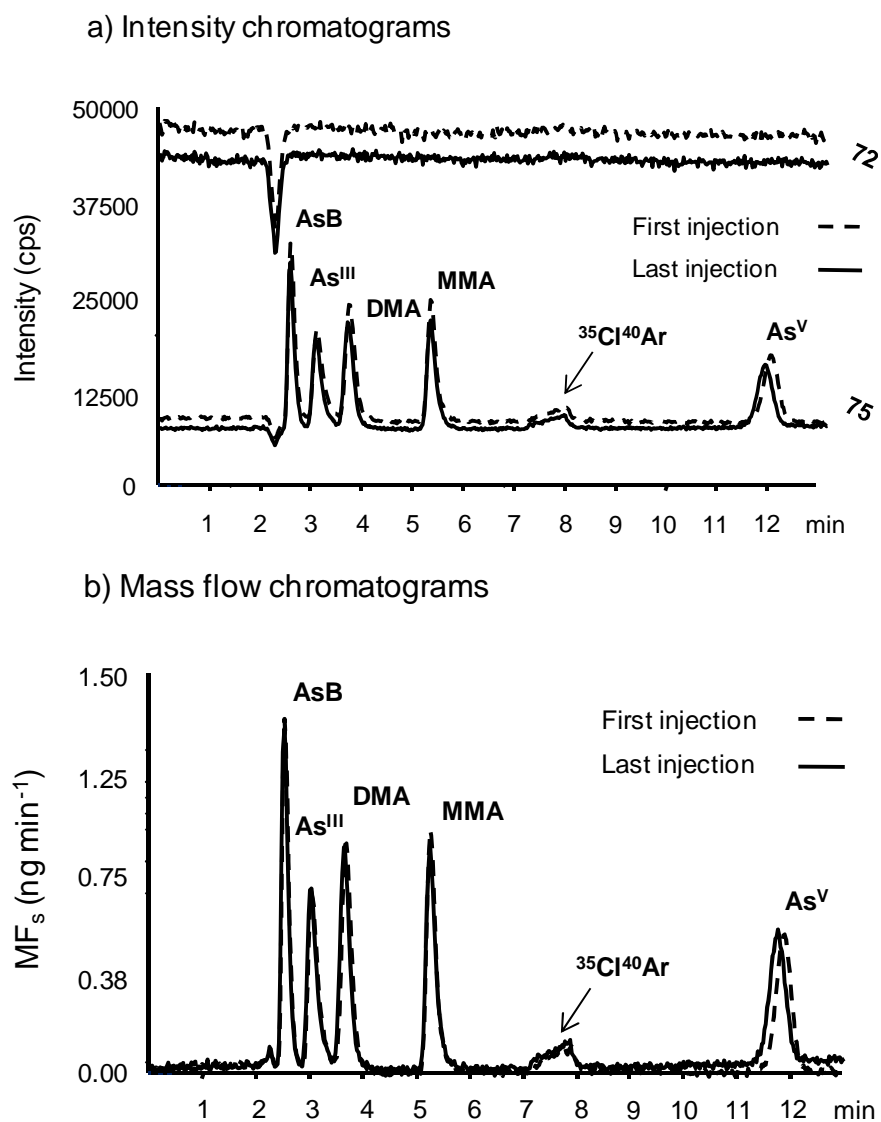


Figure 2. Use of Ge as a pseudo-isotope of As to correct for instrumental signal drift observed during a 15 h batch run.

Table 2. Comparison of different methodologies to correct for matrix effects in the analysis of a human urine sample

Method	AsB, $\mu\text{g L}^{-1}$	As ^{III} , $\mu\text{g L}^{-1}$	DMA, $\mu\text{g L}^{-1}$	MMA, $\mu\text{g L}^{-1}$	As ^V , $\mu\text{g L}^{-1}$	Sum of the species
Pseudo-unspecific IDA	15.5 \pm 0.3	ND	3.2 \pm 0.2	2.5 \pm 0.5	3.8 \pm 0.3	25.0 \pm 1.3
Internal standard calibration	16.4 \pm 0.3	ND	3.4 \pm 0.2	2.1 \pm 0.5	4.0 \pm 0.5	25.9 \pm 1.5
Standard additions	14.6 \pm 0.1	ND	3.0 \pm 0.1	2.4 \pm 0.1	3.5 \pm 0.1	23.5 \pm 0.4

4. CONCLUSIONS

A new procedure for the simultaneous determination of AsB, As^{III}, As^V, DMA and MMA in human urine which does not require any methodological calibration graph and allows correcting for instrumental instabilities has been developed. For this purpose, species unspecific isotope dilution analysis has been adapted to As using ⁷²Ge as an additional isotope of the sought element.

The proposed method has been successfully validated in spiked and unspiked human urine samples. In addition, the results were in excellent agreement with internal standard calibration and standard additions. However, the need for addition a known amount of As to normalized the Ge concentration increases appreciably the LODs.

Therefore, the possibility to carry out the quantification of As species in a single run provided by the developed procedure could be very useful to assess workplace, drinking water or food exposure to inorganic arsenic.

ACKNOWLEDGEMENTS

Fundació Caixa Castelló-Bancaixa is acknowledged for the financial support provided to Angel Castillo and for the project PB1-1B2009-29. ICP-MS measurements were made at the Servei Central d'Instrumentació Científica (SCIC), Universitat Jaume I.

We would like to thank Dr J. Ignacio García Alonso for their useful comments and help.

The authors acknowledge the financial support of Generalitat Valenciana, as research group of excellence PROMETEO/2009/054.

REFERENCES

- [1] K. T. Suzuki, B. K. Mandal and Y. Orga, *Talanta*, 2002, 58, 111.
- [2] I. Pizarro, M. Gómez, C. Cámara and M. A. Palacios, *Analytical Chim. Acta.*, 2003, 495, 85.
- [3] B. K. Mandal, Y. Orga, K. Anzai and K. T. Suzuki, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2004, 198, 307.
- [4] S. Rabieh, A. V. Hirner and J. Matschullat, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2008, 23, 544.
- [5] T. I. Todorov, J. W. Ejnik, F. G. Mullick and J. A. Centeno, *Microchim Acta*, 2005, 151, 263.
- [6] R. Xie, W. Johnson, S. Spayd, G. S. Hall and B. Buckley, *Anal. Chim. Acta*, 2006, 578, 186.
- [7] E. I. Brima, R. O. Jenkins, P. R. Lythgoe, A. G. Gault, D. A. Polya and P. I. Haris, *J. Environ. Monit.*, 2007, 9, 98.

- [8] W. C. Davis, R. Zeisler, J. R. Sieber and L. L. Yu, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2010, 396, 3041.
- [9] P. Bélanger and P. Dumas, *Atom. Spectrosc.*, 2010, 31, 175.
- [10] J. Morton and E. Leese, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2011, 399, 1781.
- [11] C. P. Verdon, K. L. Caldwell, M. R. Fresquez and R. L. Jones, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2009, 393, 939.
- [12] C. J. Park and H. Song, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2005, 20, 436.
- [13] R. Wahlen and G. Woods, *Agilent ICP-MS Journal*, May 2011, 46, 4.
- [14] P. Serapinas, G. Labarraque, P. Charlet, Z. Ezerinskas and V. Juzikiene, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2010, 25, 624.
- [15] I. B. Rodriguez, K. A. Francesconi and W. Goessler, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2008, 23, 235.
- [16] P. Rodríguez-González, J. M. Marchante-Gayón, J. I. García Alonso and A. Sanz-Medel, *Spectrochim. Acta Part B*, 2005, 60, 151.
- [17] A. Hata, Y. Endo, Y. Nakajima, M. Ikebe, M. Ogawa, N. Fujitani and G. Endo, *J. Occup. Health*, 2007, 49, 217.

CAPÍTULO 3

Especiación de Hg en muestras de agua medioambiental y tejidos de pescado

CAPÍTULO 3. ESPECIACIÓN DE Hg EN MUESTRAS DE AGUA MEDIOAMBIENTAL Y TEJIDOS DE PESCADO

3.1. Introducción.....	133
3.2. Determinación de Hg(II), MeHg, EtHg y PhHg por micro-cromatografía líquida de fase inversa.....	141
3.2.1. Bibliografía.....	148
3.2.2. Artículo científico 4.....	151
“Method optimization for the determination of four mercury species by micro-liquid chromatography–inductively coupled plasma mass spectrometry coupling in environmental water samples”	
Anal. Chim. Acta, 577 (2006) 18–25	
3.3. Aplicación del método de especiación desarrollado al estudio de la presencia de Hg en el acuífero de la Plana de Castellón.....	171
3.4. Determinación de Hg(II) y MeHg en tejidos de pescado mediante espectrometría de masas molecular y dilución isotópica específica.....	174
3.4.1. Bibliografía.....	180
3.4.2. Artículo científico 5.....	183
“Multiple spiking species-specific isotope dilution analysis by molecular mass spectrometry: simultaneous determination of inorganic mercury and methylmercury in fish tissues”	
Anal. Chem., 82 (2010) 2773–2783	

3.1. INTRODUCCIÓN

El mercurio se caracteriza por ser el único metal líquido a temperatura ambiente y presión atmosférica (temperatura de fusión $-39\text{ }^{\circ}\text{C}$, punto de ebullición $357\text{ }^{\circ}\text{C}$). Tiene un número atómico de 80 y un peso atómico de 200.59, presentando en la naturaleza un total de siete isótopos estables (^{196}Hg , ^{198}Hg , ^{199}Hg , ^{200}Hg , ^{201}Hg , ^{202}Hg y ^{204}Hg). El mercurio puede existir en tres estados de oxidación diferentes: 0 (metálico), +1 (mercurioso) y +2 (mercúrico). Las formas mercúricas y mercuriosas pueden formar un gran número de compuestos orgánicos e inorgánicos, aunque la forma mercuriosa es raramente estable bajo condiciones ambientales convencionales.^{1,2} Aunque puede disolver diversos metales para formar gran variedad de amalgamas, las formas de mercurio más comunes en el medio ambiente se pueden clasificar en tres grandes grupos: mercurio elemental, sales mercúricas inorgánicas y compuestos organomercúricos.³ Debido a su elevada volatilidad el mercurio elemental se libera a la atmósfera como vapor de mercurio desde medios acuáticos y marinos, desde la vegetación y a través de los gases procedentes de materiales geológicos y emisiones volcánicas.⁴ En la corteza terrestre se encuentra en forma de especies inorgánicas de Hg(II) (HgCl_2 , $\text{Hg}(\text{OH})_2$ y HgS) y compuestos organomercúricos, principalmente metilmercurio (MeHg) y en menor extensión etilmercurio (EtHg) y fenilmercurio (PhHg), que vienen definidos por la presencia de un enlace covalente C-Hg. Las especies mercúricas inorgánicas presentan una gran variedad de solubilidades; así el HgCl_2 es muy soluble en agua, mientras que el HgS es prácticamente insoluble. En cuanto a los compuestos organomercuriales, la mayoría no son solubles y no reaccionan con ácidos débiles o bases; sin embargo el CH_3HgOH es soluble debido a la gran capacidad del grupo hidroxilo para formar puentes de hidrógeno.²

Los usos del mercurio son muy diversos y varían dependiendo del país. Entre las principales aplicaciones cabe destacar su utilización en la producción de NaOH y Cl₂, pilas, electrodos, termómetros, barómetros, fungicidas, herbicidas, insecticidas, bactericidas, catalizadores, rellenos dentales y en la minería del oro artesanal y en pequeña escala. Como consecuencia de estas actividades antropogénicas, se ha producido una importante aportación de mercurio al medioambiente. En efecto, al encontrarse como elemento traza en combustibles fósiles es liberado en las calderas, incineradoras y crematorios. Además, la producción de cemento, papel, termómetros, sensores de presión e instrumentos de navegación así como la industria cloro-álcali por proceso de cátodo de mercurio suponen una fuente potencial de emisión de este elemento, que altera su ciclo global natural.⁵ Este ciclo consiste en el flujo continuo de mercurio entre la atmósfera, tierra y agua, y está regido por su comportamiento en los diferentes medios, las reacciones químicas implicadas, así como en parámetros de transporte. Básicamente, el mercurio se libera a la atmósfera como Hg(0), donde es oxidado a Hg(II) por el ozono y depositado por vía húmeda.⁶ Posteriormente, se puede metilar en el medio acuático y en sedimentos por la acción de microorganismos, bioacumulándose en músculos y tejidos de los seres vivos, en especial peces y moluscos.⁷

En cuanto a su toxicidad, la inhalación prolongada de vapores de mercurio puede dar lugar a diferentes dolencias respiratorias y daños en el sistema nervioso central, que desencadenan en delirios, alucinaciones y tendencias suicidas. La ingesta de mercurio inorgánico puede causar gastroenteritis ulcerosa, necrosis tubular y síndromes nefríticos agudos. Por su parte, el metilmercurio es neurotóxico. Forma un complejo con la cisteína similar a la metionina que facilita su transporte hacia el interior de las células, ocasionando daños en el sistema nervioso periférico y central que provocan debilidad neuromuscular y afectan a funciones como la coordinación, visión y audición. Además, los compuestos organomercúricos pueden atravesar la placenta con facilidad para acumularse en el feto, lo que ha originado que mujeres levemente intoxicadas con metilmercurio hayan dado a luz bebés con parálisis cerebrales severas.⁸ Todo ello ha motivado que se incluya “el Hg y sus compuestos” en la lista de contaminantes prioritarios de la Unión Europea (Decisión 2455/2001/EC) relativa a la

calidad de las aguas y se ha establecido un nivel máximo de $0.5 \mu\text{g Hg g}^{-1}$ (peso húmedo) para distintos comestibles (Reglamento de la Comisión 78/2005). En los Estados Unidos, la Agencia para la Protección Medioambiental (EPA) ha emitido recientemente la "Guía para la aplicación del criterio de calidad de Enero del 2001 sobre el metilmercurio en el agua", en la cual se recomienda un nivel máximo de $0.3 \mu\text{g}$ de metilmercurio g^{-1} de tejido de pescado (peso húmedo) para peces de agua dulce, de estuario y marisco.

Como consecuencia de esta diferente toxicidad, la actividad analítica para el mercurio está dirigida hacia la determinación de las diferentes especies. Para llevar a cabo la especiación de Hg se suele combinar una técnica de separación como cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) o cromatografía de gases (GC) con un detector específico de mercurio, incluyendo espectrofotometría de fluorescencia atómica (AFS), espectrofotometría de emisión atómica (AES), espectrofotometría de absorción atómica (AAS) y espectrometría de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS).⁹⁻¹¹ La técnica de detección más utilizada es el ICP-MS, principalmente gracias a su elevada sensibilidad, capacidad multiisotópica y especificidad de la intensidad de la señal del elemento determinado.¹²⁻¹⁴ A diferencia de los métodos basados en HPLC, al utilizar GC se debe extraer el mercurio inorgánico y organomercurio de la matriz de muestra y derivatizarse para formar especies volátiles térmicamente estables.¹⁰ De manera que el uso de HPLC-ICP-MS permite simplificar notablemente los análisis, especialmente cuando se quiere llevar a cabo la especiación de mercurio en muestras de agua medioambiental. Por el contrario, los menores límites de detección proporcionados por el acoplamiento GC-ICP-MS lo convierten en la opción más adecuada para la determinación de mercurio en tejidos biológicos.¹⁵ Para corregir los procesos no cuantitativos derivados de la extracción y derivatización así como el efecto matriz en este tipo de muestras se suele hacer uso de calibración por adiciones estándar,¹⁶ aunque la estrategia preferida consiste en el análisis por dilución isotópica específica.¹⁴ En esta técnica, se fortifica la muestra al inicio del proceso analítico con un patrón de la especie que se quiere determinar enriquecida en un isótopo de mercurio. Sin embargo, a menudo se producen interconversiones entre especies que comprometen la exactitud y precisión de los

análisis, por lo que recientemente se han desarrollado procedimientos basados en el análisis por dilución isotópica para trazadores múltiples.^{17,18}

En el presente capítulo se han desarrollado dos métodos de especiación de Hg para aguas medioambientales y tejidos de pescado basados en los acoplamientos microHPLC-ICP-MS y GC-MS, respectivamente. En el primero de ellos, correspondiente al **artículo científico 4**, se han examinado las ventajas que ofrecen los nebulizadores de bajo caudal cuando se utilizan gradientes de disolvente orgánico. Como se ha comentado, el uso de cromatografía líquida hace posible la inyección directa, sin tratamiento de muestra previo, de matrices sencillas tales como aguas medioambientales. Sin embargo, la elución de compuestos organomercurícos requiere la adición de un modificador orgánico, que provoca una considerable depresión de la señal. Para atenuar este problema se ha propuesto la disminución del flujo de fase móvil a unos pocos $\mu\text{L min}^{-1}$. En estas condiciones resulta imprescindible la utilización de una columna microbore y un sistema de cromatografía capilar para reducir debidamente el volumen muerto, además de un micronebulizador, que proporciona mayores eficiencias de transporte que los convencionales al introducir bajos caudales. En este sentido, se ha llevado a cabo un estudio exhaustivo de las condiciones de análisis para conseguir separar todas las especies minimizando en lo posible la inestabilidad instrumental. Se comprobó que el metanol ocasionaba una menor depresión de la señal que el acetonitrilo, por lo que se ha optimizado la separación cromatográfica utilizando un gradiente de fase móvil basado en metanol. Paralelamente, se ha evaluado el comportamiento de varios nebulizadores, observándose los mejores resultados con el micronebulizador Micromist. Además, el caudal de gas nebulizador ha resultado ser un factor clave para conseguir la detección simultánea de todas las especies de mercurio seleccionadas a bajas concentraciones. Se ha observado que cuanto mayor es el porcentaje orgánico en la fase móvil, menor es el caudal de gas requerido para obtener una nebulización óptima. Así, el gradiente de metanol utilizado provoca una variación de la sensibilidad durante el cromatograma, que hace necesario llegar a un compromiso entre los compuestos de mercurio que presentan mayor y menor retención. Otro factor a tener en cuenta ha sido el contenido de Hg de los reactivos utilizados en las fases móviles,

que puede provocar un fuerte incremento de la línea base, principalmente a la llegada del gradiente, que compromete la determinación de los compuestos. Finalmente, se han evaluado las características analíticas de la metodología propuesta y se han comparado los LODs con otros procedimientos basados en HPLC reportados en la bibliografía. El método desarrollado se aplicó posteriormente a diferentes aguas de pozos de riego y abastecimiento urbano localizadas en el acuífero de la Plana de Castellón, lo que permitió presentar los primeros datos sobre los niveles de mercurio inorgánico y compuestos organomercurícos en estos enclaves.

En el **artículo científico 5** se ha diseñado un procedimiento de especiación de mercurio en muestras biológicas basado en dilución isotópica específica de trazadores múltiples para GC-MS. Esta instrumentación está ampliamente extendida en los laboratorios de ensayo debido a su bajo coste y menor sofisticación en comparación con GC-ICP-MS, por lo que aparece como una prometedora alternativa a este acoplamiento. No obstante, al ser el GC-MS un detector molecular generará una distribución de isotopómeros de masa en lugar de proporcionar directamente las abundancias isotópicas del Hg. En primer lugar, se han utilizado las abundancias certificadas de cada uno de los átomos presentes en los *clusters* moleculares seleccionados para calcular los perfiles isotópicos del compuesto natural y de los marcados después de ser derivatizados. Al comparar estos valores con los experimentales se ha podido determinar la pureza espectral de los mismos y recalcular apropiadamente las abundancias teóricas del compuesto natural y de los marcados isotópicamente. En este trabajo se ha utilizado mercurio inorgánico enriquecido con ^{199}Hg y metilmercurio enriquecido con ^{201}Hg para corregir los procesos de metilación y desmetilación, respectivamente, que pueden tener lugar durante el tratamiento de muestra. Las concentraciones de los dos trazadores se han certificado por GC-ICP-MS mediante dilución isotópica inversa y se han comparado con GC-MS. Se observó que la disolución de metilmercurio enriquecida en ^{201}Hg contenía una impureza de Hg(II), de manera que este hecho ha sido tenido en cuenta en los cálculos. El procedimiento utilizado se basa en la deconvolución de los diferentes perfiles isotópicos que contribuyen a los picos de Hg(II) y MeHg propilados mediante mínimos cuadrados. Posteriormente, se establecen balances molares que permiten obtener los factores de

transformación y las concentraciones de Hg(II) y MeHg corregidas, es decir, antes de que tuvieran lugar dichos procesos. La metodología propuesta se ha aplicado inicialmente a agua de mar fortificada para comprobar que se corregían adecuadamente las interconversiones, que fueron promovidas mediante irradiación por microondas. Posteriormente, se han optimizado las condiciones de extracción de las especies de mercurio a pH básico en muestras biológicas utilizando un microondas focalizado. El efecto del reactivo derivatizante y la purificación de los extractos también han sido minuciosamente estudiados. Por último, se ha validado el método desarrollado mediante el análisis de dos materiales de referencia y con la comparación de los resultados obtenidos con GC-ICP-MS.

Bibliografía

1. Lee, D.S.; Nemitz, E.; Hill, P.; Clegg, S.; Kingdon, R.D. *Sources, sink and levels of atmospheric mercury in the UK*. DERA Report, **2000**.
2. EPA Mercury study report to congress, Volume III, "*Fate and transport of mercury in the environment*", **1997**.
3. Léonard, A. *Metals and metalloids, and their ions and compounds*. In: Merian, E. (Ed.), *Metals and their compounds in the environment*. VCH, Weinheim, **1991**; pp. 751-774.
4. UNEP Chemicals Branch. "*Global atmospheric mercury assessment: sources, emissions and transport*". Geneva: United Nations Environment Programme Chemicals Branch; **2008**.
5. Hylander, L.D.; Meili, M. *500 years of mercury production: global annual inventory by region until 2000 and associated emissions*. *Sci. Total Environ.* **2003**, 304, 13-27.
6. Carpi, A. *Mercury from combustion sources: A review of the chemical species emitted and their transport in the atmosphere*. *Water, Air, and Soil Pollut.* **1997**, 98, 241-154.
7. Shimshack, J.P.; Ward, M.B.; Beatty, T.K.M. *Mercury advisories: Information, education, and fish consumption*. *J. Environ. Econom. Manage.* **2007**, 53, 158-179.
8. EPA Mercury study report to congress, Volume V, "*Health effects of mercury and mercury compounds*", **1997**.
9. Stoichev, T.; Amouroux, D.; Rodriguez Martin-Doimeadios, R.C.; Monperrus, M.; Donard, O.F.X.; Tsalev, D.L. *Speciation analysis of mercury in aquatic environment*. *Appl. Spectrosc. Rev.* **2006**, 41, 591-619.
10. Leermakers, M.; Baeyens, W.; Quevauviller, P.; Horvat, M. *Mercury in environmental samples: speciation, artifacts and validation*. *Trends Anal. Chem.* **2005**, 24, 383-393.
11. Harrington, C.F. *The speciation of mercury and organomercury compounds by using high-performance liquid chromatography*. *Trends Anal. Chem.* **2000**, 19, 167-179.

12. Popp, M.; Hann, S.; Koellensperger, G. *Environmental application of elemental speciation analysis based on liquid or gas chromatography hyphenated to inductively coupled plasma mass spectrometry—A review*. *Anal. Chim. Acta* **2010**, 668, 114-129.
13. Meng, W.; Weiyue, F.; Junwen, S.; Fang, Z.; Bing, W.; Motao, Z.; Bai, L.; Yuliang, Z.; Zhifang, C. *Development of a mild mercaptoethanol extraction method for determination of mercury species in biological samples by HPLC-ICP-MS*. *Talanta* **2007**, 71, 2034-2039.
14. Rodríguez Martín-Doimeadios, R.C.; Krupp, E.; Amouroux, D.; Donard, O.F.X. *Application of isotopically labeled methylmercury for isotope dilution analysis of biological samples using gas chromatography/ICPMS*. *Anal. Chem.* **2002**, 74, 2505-2512.
15. Sánchez Uría, J.E.; Sanz-Medel, A. *Inorganic and methylmercury speciation in environmental samples*. *Talanta* **1998**, 47, 509-524.
16. Carrasco, L.; Díez, S.; Bayona, J.M. *Methylmercury determination in biota by solid-phase microextraction. Matrix effect evaluation*. *J. Chromatogr. A* **2007**, 1174, 2-6.
17. Monperrus, M.; Rodríguez-González, P.; Amouroux, D.; García Alonso, J.I.; Donard, O.F.X. *Evaluating the potential and limitations of double-spiking species-specific isotope dilution analysis for the accurate quantification of mercury species in different environmental matrices*. *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, 390, 655-666.
18. Rahman, G.M.M.; Kingston, H.M. *Application of speciated isotope dilution mass spectrometry to evaluate extraction methods for determining mercury speciation in soils and sediments*. *Anal. Chem.* **2004**, 76, 3548-3555.

3.2. DETERMINACIÓN DE Hg(II), MeHg, EtHg Y PhHg POR MICRO-CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE FASE INVERSA

Tal y como se ha mencionado con anterioridad, el acoplamiento HPLC-ICP-MS es una de las herramientas más potentes para la determinación de especies metálicas. En el caso de compuestos orgánicos e inorgánicos de mercurio se suelen utilizar columnas de fase inversa, añadiéndose un agente quelante o formador de pares iónicos para mejorar la separación cromatográfica y/o evitar la adsorción de las especies de mercurio en la fase estacionaria.^{1,2} En este sentido, el uso de L-cisteína está ampliamente extendido dada su capacidad para formar complejos con los compuestos de mercurio.^{1,3,5} También suele ser necesaria la adición de modificadores orgánicos para conseguir eluir los compuestos más retenidos, lo cual provoca una serie de cambios físicos en el plasma. Así, el ICP-MS limita el uso de estos disolventes porque provocan un deterioro en su comportamiento. La pirólisis de los disolventes orgánicos de alta presión de vapor, como el metanol y el acetonitrilo, disminuye el poder de ionización del plasma y empeora la sensibilidad.⁶ Además, hay una deposición continua de carbón en los conos que ocasiona la degradación de la señal.^{4,7,8}

La aplicación de microflujos reduce el contenido orgánico en el plasma y puede atenuar los problemas derivados de su utilización. Son más fáciles de nebulizar, provocan menos efecto matriz y permiten el uso de columnas microbore (0.5-2.1 mm d.i.), que hacen posible la disminución del consumo de disolventes y el tiempo de análisis. Sin embargo, el empleo de nebulizadores neumáticos clásicos no es adecuado para trabajar con microflujos, ya que presentan una eficiencia de transporte de masa demasiado baja (<5%), lo que se traduce en una cantidad de analito transportada al plasma insuficiente.⁹ Además, producen un aerosol grueso y presentan un volumen muerto excesivo.⁹⁻¹¹ Para solventar estos problemas, se ha propuesto el uso de micronebulizadores, que son capaces de generar un aerosol estable a flujos de fase móvil del orden de unos pocos microlitros por minuto, al tiempo que disminuyen significativamente los volúmenes muertos debido a la reducción de las dimensiones de su capilar de muestra.¹²

En este trabajo se ha estudiado el potencial del acoplamiento microHPLC-ICP-MS como alternativa al HPLC-ICP-MS convencional para llevar a cabo la especiación de Hg^{2+} , MeHg, EtHg y PhHg en aguas. Los diferentes compuestos se separaron en una microcolumna de fase inversa Interchrom (100 mm x 1 mm d.i.) C_{18} con un tamaño de partícula de 3 μm , que fue acoplada al ICP-MS mediante un micronebulizador MicroMist-100. Para conseguir la elución del PhHg, que queda fuertemente retenido en la fase estacionaria, fue necesario utilizar un gradiente de metanol, el cual compromete la estabilidad del plasma. Por consiguiente, paralelamente a la optimización de la separación cromatográfica de los compuestos de Hg se realizó un estudio del comportamiento del ICP-MS al introducir distintas mezclas metanol-agua. De esta forma se buscó reproducir los cambios físico-químicos que experimenta el plasma durante el gradiente, para así poder escoger las condiciones de nebulización más idóneas.

El experimento, no incluido en el **artículo científico 4**, consistió en la introducción directa en el ICP-MS (sin columna cromatográfica) de disoluciones patrón de 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ Hg con porcentajes crecientes de metanol (0, 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5 y 15%) a 50, 65, 80 y 95 $\mu\text{L min}^{-1}$. En primer lugar, se realizó un ajuste del caudal de gas nebulizador, Q_g , al bombear el patrón con menor contenido orgánico para cada uno de los caudales de líquido, de manera que se obtuviera la máxima señal. Una vez fijado este valor, se midió la señal y la desviación estándar relativa, RSD, de todas las disoluciones. A continuación, se optimizó Q_g para la disolución de Hg con mayor porcentaje de metanol y se procedió de manera análoga a la anterior. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 3.1 y Figura 3.2, permitiendo establecer las siguientes conclusiones:

- Cuanto mayor fue el flujo de líquido, Q_l , menor valor de Q_g debió ser seleccionado para incrementar la sensibilidad: Este hecho se justifica por la mayor carga de disolvente en el plasma, S_{tot} , al aumentar Q_l , que puede ser paliado disminuyendo ligeramente Q_g .
- Al aumentar el porcentaje de metanol fue necesario aplicar menores Q_g , para todos los Q_l evaluados: Los aerosoles que contienen disolventes orgánicos presentan menores tamaños de gota medio que los aerosoles acuosos. Esta

disminución provoca una mayor eficiencia en el transporte de analito pero también de disolvente, lo que resulta en un aumento excesivo de S_{tot} que se traduce en una supresión de la señal. Este efecto negativo se puede mitigar aplicando un menor Q_g , que permite reducir notablemente la cantidad de disolvente orgánico en el plasma sin disminuir excesivamente la de analito.

- Una vez fijado el valor óptimo de Q_g para 0% de metanol, se observó que al bombear los patrones de Hg con un contenido orgánico creciente la señal disminuía drásticamente (Figura 3.1a). No obstante, esta pérdida de sensibilidad fue mucho menos acentuada cuando se optimizó Q_g para 15% de metanol y se introdujeron las disoluciones con 12.5 y 10% de metanol (Figura 3.1b): De acuerdo con el punto anterior, la reducción de Q_g comporta una menor carga de disolvente en el plasma y en consecuencia un aumento de señal. Sin embargo, la sensibilidad obtenida al optimizar Q_g para 15% de metanol es menor que para 0%, lo que indica que para este elevado porcentaje de disolvente orgánico no es posible corregir totalmente su efecto negativo en el ICP-MS. Consecuentemente, al ir reduciendo el porcentaje orgánico se produce un menor deterioro del comportamiento del plasma, que compensa en parte la menor eficiencia de transporte de analito, lo que resulta en una bajada de señal más suavizada.
- Cuando se ajustó Q_g para el patrón de Hg con un 15% de metanol, la disminución del contenido orgánico condujo a RSD% significativamente mayores que cuando se optimizó para 0% y se aumentaron los porcentajes de disolvente orgánico (Figura 3.2): Para explicar estas observaciones hay que tener en cuenta que a medida que disminuye el porcentaje orgánico aumenta el tamaño de gota medio del aerosol, requiriendo un mayor Q_g . Así, el caudal de gas óptimo para un 15% de metanol no es suficiente para formar adecuadamente el aerosol de menores contenidos orgánicos. Esto provoca una mayor dispersión en el tamaño de las microgotas del aerosol y, en consecuencia, una mayor imprecisión de la señal.

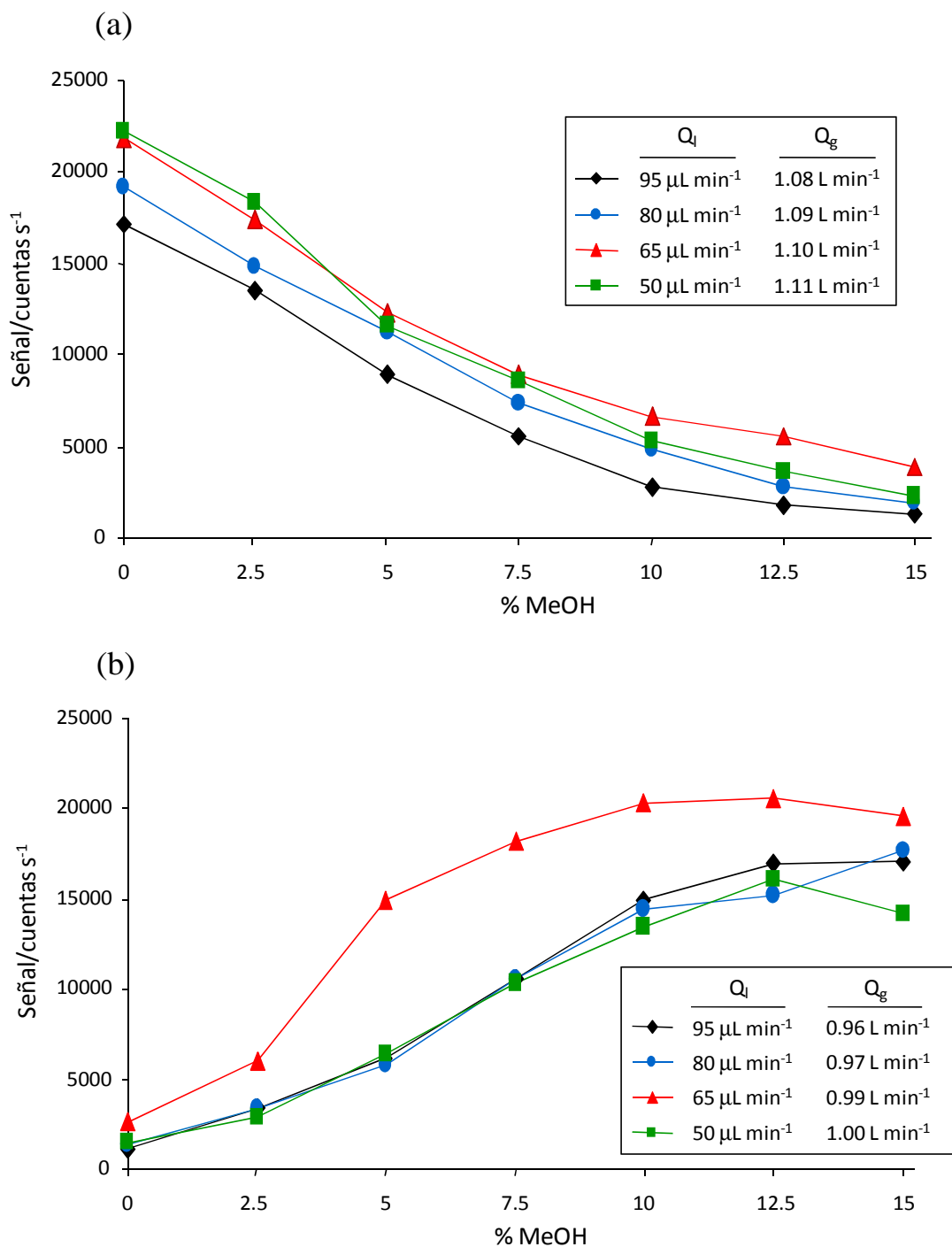


Figura 3.1. Efecto del porcentaje de metanol en la respuesta del ICP-MS para diferentes flujos de fase móvil, Q_i . Caudal de gas nebulizador, Q_g , optimizado para (a) 0% de metanol y (b) 15% de metanol.

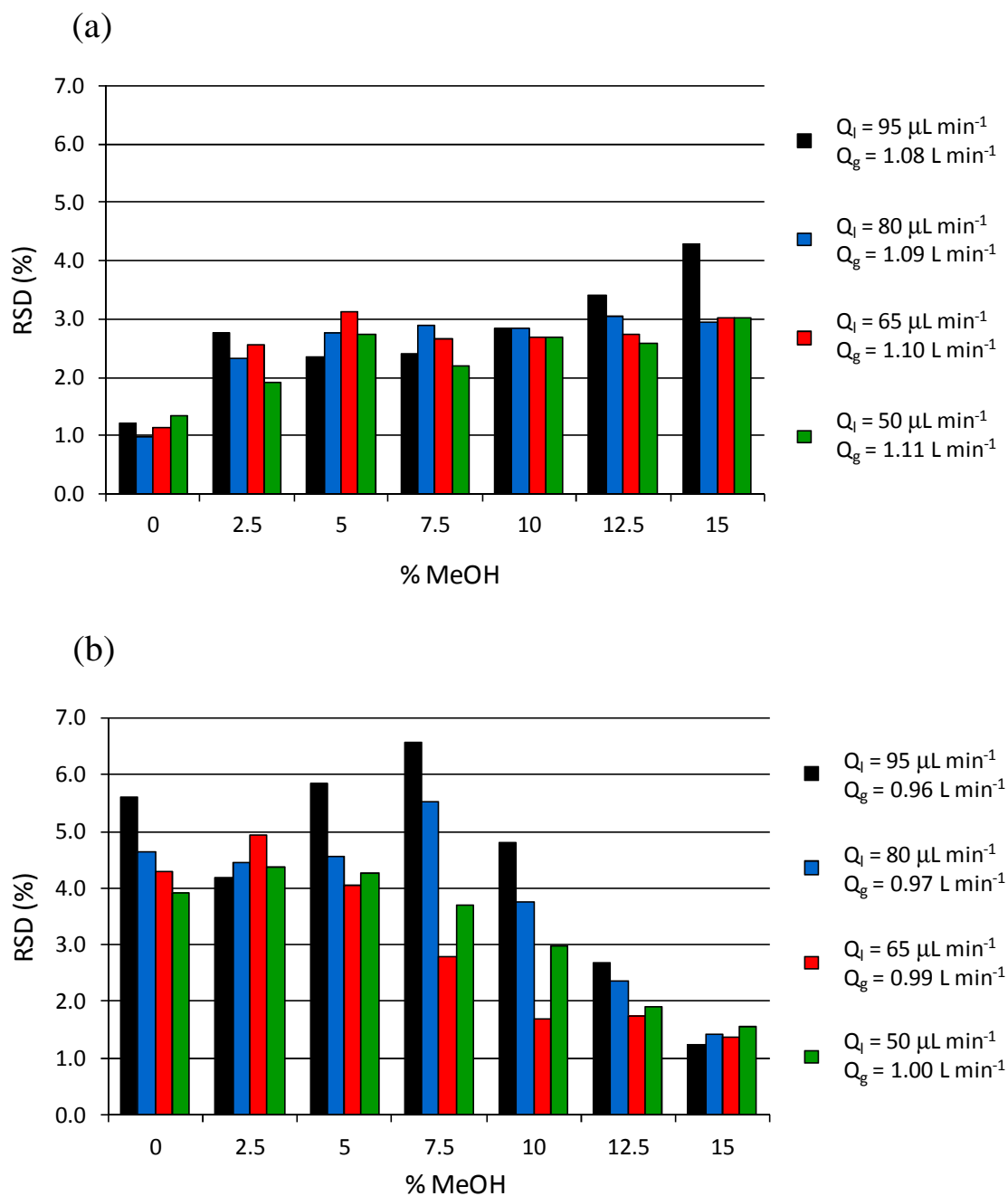


Figura 3.2. Efecto del porcentaje de metanol en la estabilidad de la señal ^{202}Hg para diferentes flujos de fase móvil. (a) Q_g optimizado para 0% de metanol (b) Q_g optimizado para 15% de metanol.

Estas observaciones ponen de manifiesto la variación en la capacidad de ionización que experimenta el plasma durante la separación cromatográfica, debido a que cada especie de Hg eluye con un contenido orgánico diferente. Finalmente, se seleccionaron dos fases móviles con un 1 y 10% de metanol, permitiendo la separación cromatográfica de todas las especies en menos de 13 minutos. De acuerdo con el experimento anterior, se realizó el ajuste diario de Q_g , previo al acoplamiento, para un patrón de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ Hg con 5% metanol introducido a $70 \mu\text{L min}^{-1}$, como compromiso entre los porcentajes de metanol utilizados

El método desarrollado se validó para aguas superficiales y subterráneas fortificadas con 0.5 y $10 \mu\text{g L}^{-1}$ (referido a Hg) de cada especie. Se obtuvieron recuperaciones de 85-100%, RSDs ($n = 6$) alrededor del 2% y límites de detección que oscilaron entre 8 y 32 ng L^{-1} . En consecuencia, a pesar de la continua variación de sensibilidad causada por el gradiente de modificador orgánico, el acoplamiento microHPLC-ICP-MS proporcionó una adecuada robustez y sensibilidad.

Cabe señalar que las muestras se inyectaron directamente en el equipo sin realizar ningún tratamiento previo, minimizando con ello los errores que pueden conllevar la manipulación de la muestra y las etapas de derivatización. Sin embargo, las recuperaciones obtenidas para agua residual depurada y agua de mar fueron inaceptablemente bajas, lo cual sugiere la necesidad de una purificación previa a la separación cromatográfica para aguas con un alto contenido salino.

La pureza de los reactivos y disolventes utilizados en la fase móvil resultó ser un factor a tener muy en cuenta de cara a conseguir discernir entre la señal de analito y el ruido de fondo para bajas concentraciones de los compuestos determinados. En efecto, el elevado contenido de Hg que contenían algunos lotes del agente complejante incrementó notablemente el nivel de la línea base y con ello su ruido asociado. Además, el problema se agravó con el aumento repentino que experimenta la señal con la llegada del gradiente de metanol, alrededor de los 5 min, que al solaparse con el pico de EtHg dificulta sobremanera su determinación.

En cuanto a la mejora en la eficiencia de la separación que el uso de la columna microbore tenía que comportar, dado el menor tamaño de partícula de su

empaquetamiento, hay que señalar que no se cumplieron las expectativas, ya que se obtuvieron anchuras de pico comparables a las proporcionadas por las columnas convencionales. Este comportamiento anómalo se atribuyó principalmente al gran efecto memoria del mercurio en la microcolumna y micronebulizador, así como por el uso de una fase estacionaria C18 poco adecuada. Sin embargo, un estudio posterior indicó que la pérdida de eficiencia era consecuencia del ensanchamiento extracolumna que tiene lugar en el capilar del micronebulizador utilizado. Este fenómeno y la solución adoptada para corregirlo se explica detalladamente en el **artículo científico 2**.

3.2.1. Bibliografía

1. Bramanti, E.; Lomonte, C.; Onor, M.; Zamboni, R.; D'Ulivo, A.; Raspi, G. *Mercury speciation by liquid chromatography coupled with on-line chemical vapour generation and atomic fluorescence spectrometric detection (LC-CVGAFS)*. *Talanta* **2005**, 66, 762-768.
2. Sarzanini, C.; Sacchero, G.; Aceto, M.; Abollino, O.; Mentasti, E. *Ion chromatographic separation and on-line cold vapour atomic absorption spectrometric determination of methylmercury, ethylmercury and inorganic mercury*. *Anal. Chim. Acta* **1994**, 284, 661-667.
3. Harrington, C.F. *The speciation of mercury and organomercury compounds by using high-performance liquid chromatography*. *Trends Anal. Chem.* **2000**, 19, 167-179.
4. Wan, C.; Chen, C.; Jiang, S. J. *Determination of mercury compounds in water samples by liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry with an in situ nebulizer/vapor generator*. *Atom. Spectrom.* **1997**, 12, 683-687.
5. Ho, Y.-S.; Uden, P.C. *Determination of inorganic Hg(II) and organic mercury compounds by ion-pair high-performance liquid chromatography*. *J. Chromatogr. A* **1994**, 688, 107-116.
6. Todolí, J.L.; Canals, A.; Hernandis, V. *Behaviour of a single-bore high-pressure pneumatic nebulizer operating with alcohols in inductively coupled plasma atomic emission spectrometry*. *J. Anal. At. Spectrom.* **1996**, 11, 949-956.
7. Seubert, A. *On-line coupling of ion chromatography with ICP-AES and ICP-MS*. *Trends Anal. Chem.* **2001**, 20, 274-287.
8. Ackley, K.L.; Sutton, K.L.; Caruso, J.A. *Comparison of nebulizers for microbore LC-ICP-MS with mobile phases containing methanol*. *J. Anal. At. Spectrom.* **2000**, 15, 1069-1073.
9. Maestre, S.E.; Todolí, J.L.; Mermet, J.M. *Evaluation of several pneumatic micronebulizers with different designs for use in ICP-AES and ICP-MS. Future directions for further improvement*. *Anal. Bioanal. Chem.* **2004**, 379, 888-899.

10. Garraud, H.; Woller, A.; Fodor, P.; Donard, O.F.X. *Trace elemental speciation by HPLC using microbore columns hyphenated to atomic spectrometry: A review.* *Analisis* **1997**, 25, 25-31.
11. Shum, S.C.K.; Pang, H.; Houk, R.S. *Speciation of mercury and lead compounds by microbore column liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry with direct injection nebulization.* *Anal. Chem.* **1992**, 64, 2444-2450.
12. Todolí, J.L.; Mermet, J.M. *Elemental analysis of liquid microsamples through inductively coupled plasma spectrochemistry.* *Trends Anal. Chem.* **2005**, 24, 107-116.

3.2.2. Artículo científico 4

“Method optimization for the determination of four mercury species by micro-liquid chromatography–inductively coupled plasma mass spectrometry coupling in environmental water samples”

A. Castillo, A.F. Roig-Navarro and O.J. Pozo.

Analytica Chimica Acta, 577 (2006) 18–25.



Available online at www.sciencedirect.com



Analytica Chimica Acta 577 (2006) 18–25

ANALYTICA
CHIMICA
ACTA

www.elsevier.com/locate/aca

Method optimization for the determination of four mercury species by micro-liquid chromatography–inductively coupled plasma mass spectrometry coupling in environmental water samples

A. Castillo, A.F. Roig-Navarro*, O.J. Pozo

Research Institute for Pesticides and Water, Universitat Jaume I, E-12071 Castellón, Spain

Received 13 March 2006; received in revised form 12 June 2006; accepted 12 June 2006

Available online 16 June 2006

Abstract

A method based on the coupling microHPLC–microneb–ICPMS has been developed for Hg(II), MeHg⁺, EtHg⁺ and PhHg⁺ species. Gradient elution using methanol and L-cysteine at pH 3.0 allowed the chromatographic separation of all species in less than 13 min (total analysis time 15 min). The direct coupling of microLC to ICPMS through a Micromist nebulizer permits the analysis of environmental water without sample pretreatment and derivatization steps. Nebulizer type, organic modifier and column length were the main parameters tested. The methanol content and pH of the mobile phase greatly affected the retention time and sensitivity of the method. Key factors to obtain high signal to noise ratio, at concentrations below 1 µg L⁻¹, were found to be the nebulization step and traces of Hg present in the complexing agent. A detailed optimization of carrier and make up gas flow rates have enabled the nebulization of the methanol gradient elution with good mass transport efficiency, low organic solvent loading into the plasma and excellent precision.

The performance of the microHPLC–microneb–ICPMS method developed was evaluated on a surface water sample filtered (0.22 µm) and spiked with 0.5 µg L⁻¹ (as Hg) of each species. Precision (R.S.D., *n* = 6) for all species of Hg varied from 0.5 to 2.1%. Detection limit, defined as three times the standard deviation (*n* = 6), ranged from 8 ng L⁻¹ for EtHg⁺ to 32 ng L⁻¹ for PhHg⁺ and was noticeably lower than those reported in previous LC-based methods. Accuracy was suitable with recoveries ranging from 85 to 100% when tested at two levels (0.5 and 10 µg L⁻¹) in groundwater samples. Recovery was matrix affected when water samples of high salinity (depurated wastewater and seawater) were used.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Mercury speciation; Microbore column; Micro-liquid chromatography; Micronebulizer; Inductively coupled plasma mass spectrometry; Water

1. Introduction

Nowadays, metal speciation analysis at ultra trace levels is needed to perform a correct assessment of the potential effects of metal pollution [1–3]. Mercury is one of the most toxic elements and a great concern exists to know the levels of its chemical forms in the environment. It is now present worldwide at levels that may adversely affect humans and wildlife [4]. Even under current regulations, many uses of mercury may not only result in the release of the most studied mercury compounds to the global environment, elemental mercury and methylmercury, but also in other organomercurials, such as phenylmercury or ethylmercury, although to a much lesser extent.

The most common methods applied for mercury speciation are based on the use of gas chromatography (GC) [3,5–9] or liquid chromatography (HPLC) [2,10–18] coupled to element-specific detection. GC is normally preferred for non-polar, volatile species or species which are able to form easily derivatives without uncontrolled changes of the compound in the derivatization/separation processes involved [1,13]. However, HPLC techniques are better suited for polar species separation, and in principle might be advantageous for organomercury and inorganic mercury speciation. In addition, the use of HPLC could simplify sample treatment and eliminate the derivatization step, and it is easier to automate and is more flexible, as there are more separation mechanisms available (such as reversed-phase, ionic, ion pairing ...) [17,18]. However, HPLC methods are typically less sensitive than GC ones, which is an important drawback when faced with real samples [17,19].

* Corresponding author. Tel.: +34 964 728068; fax: +34 964 728066.
E-mail address: roig@exp.uji.es (A.F. Roig Navarro).

ANALYTICA CHIMICA ACTA

Anal. Chim. Acta, 577 (2006) 18–25

Received: 13 March 2006; Accepted: 12 June 2006; Published online: 16 June 2006 in ScienceDirect
(www.sciencedirect.com) DOI: 10.1016/j.aca.2006.06.024

Method optimization for the determination of four mercury species by micro-liquid chromatography–inductively coupled plasma mass spectrometry coupling in environmental water samples

A. Castillo, A.F. Roig-Navarro, O.J. Pozo

Research Institute for Pesticides and Water, Universitat Jaume I, E-12071 Castelló, Spain

ABSTRACT

A method based on the coupling microHPLC–microneb-ICPMS has been developed for Hg(II), MeHg⁺, EtHg⁺ and PhHg⁺ species. Gradient elution using methanol and L-cysteine at pH 3.0 allowed the chromatographic separation of all species in less than 13 min (total analysis time 15 min). The direct coupling of microLC to ICPMS through a Micromist nebulizer permits the analysis of environmental water without sample pretreatment and derivatization steps. Nebulizer type, organic modifier and column length were the main parameters tested. The methanol content and pH of the mobile phase greatly affected the retention time and sensitivity of the method. Key factors to obtain high signal to noise ratio, at concentrations below 1 µg L⁻¹, were found to be the nebulization step and traces of Hg present in the complexing agent. A detailed optimization of carrier and make up gas flow rates have enabled the nebulization of the methanol gradient elution with good mass transport efficiency, low organic solvent loading into the plasma and excellent precision.

The performance of the microHPLC–microneb-ICPMS method developed was evaluated on a surface water sample filtered (0.22 µm) and spiked with 0.5 µg L⁻¹ (as Hg) of each species. Precision (R.S.D., $n = 6$) for all species of Hg varied from 0.5 to 2.1%. Detection limit, defined as three times the standard deviation ($n = 6$), ranged from 8 ng L⁻¹ for EtHg⁺ to 32 ng L⁻¹ for PhHg⁺ and was noticeably lower than those reported in previous LC-based methods. Accuracy was suitable with recoveries ranging from 85 to 100% when tested at two levels (0.5 and 10 µg L⁻¹) in groundwater samples. Recovery was matrix affected when water samples of high salinity (depurated wastewater and seawater) were used.

KEYWORDS

Mercury speciation; Microbore column; Micro-liquid chromatography; Micronebulizer; Inductively coupled plasma mass spectrometry; Water

1. INTRODUCTION

Nowadays, metal speciation analysis at ultra trace levels is needed to perform a correct assessment of the potential effects of metal pollution [1–3]. Mercury is one of the most toxic elements and a great concern exists to know the levels of its chemical forms in the environment. It is now present worldwide at levels that may adversely affect humans and wildlife [4]. Even under current regulations, many uses of mercury may not only result in the release of the most studied mercury compounds to the global environment, elemental mercury and methylmercury, but also in other organomercurials, such as phenylmercury or ethylmercury, although to a much lesser extent.

The most common methods applied for mercury speciation are based on the use of gas chromatography (GC) [3,5–9] or liquid chromatography (HPLC) [2,10–18] coupled to element-specific detection. GC is normally preferred for non-polar, volatile species or species which are able to form easily derivatives without uncontrolled changes of the compound in the derivatization/separation processes involved [1,13]. However, HPLC techniques are better suited for polar species separation, and in principle might be advantageous for organomercury and inorganic mercury speciation. In addition, the use of HPLC could simplify sample treatment and eliminate the derivatization step, and it is easier to automate and is more flexible, as there are more separation mechanisms available (such as reversed-phase, ionic, ion pairing ...) [17,18]. However, HPLC methods are typically less sensitive than GC ones, which is an important drawback when faced with real samples [17,19].

Mercury compounds usually require the addition of a chelating or ion-pair reagent, such as L-cysteine [10,12,14,19] in reversed-phase LC separations in order to improve separation and to avoid adsorption of mercury compounds to the stationary phase [11,12].

ICPMS is one of the most attractive detection systems for elemental speciation in HPLC-based methods owing to the excellent detection limits reached (sub-ppb or lower for most elements), its multi-element capability, wide linear dynamic range and its ability to measure isotope ratios [15,19,20]. Although regarded as straightforward, LC-ICPMS coupling shows some limitations. Typically, classical nebulizers produce a rather coarse aerosol [21], suffer from low analyte transport efficiencies (<5%), are inadequate for low flow rates of eluent and generate

large dead volumes [16,20,21]. Moreover, the introduction of organic solvents results in physical changes of the plasma, and carbon deposits may also be formed on the cones causing signal degradation over time. Thus, the organic modifier of HPLC mobile phases causes a diminution in the ionization power of the plasma and contributes to an increase in the background noise [14,15,22].

To minimize problems pneumatic nebulizers should be operated at conditions (liquid and gas flow rates) where efficiency is practically independent of the flow rate. Otherwise, variations in flow rate stability may greatly affect the accuracy and reproducibility of the observed detector count rate [22]. The flow rate can be affected by variations in the organic modifier content of the mobile phase; hence this fact can be of capital importance when gradient elution is used.

Coupling microbore HPLC through a micronebulizer to ICPMS results in a stable, finer aerosol, the amount of solvent introduced into the plasma is reduced and the analyte mass flow increases [23].

Major advantages claimed for microbore columns (0.5–2.1 mm i.d.) [15] are increased sensitivity and better resolution power. Reduction of the internal diameter should increase the relative peak concentration, and the reduced transversal diffusion of the analyte should also provide smaller peak widths [20]. Other advantages, such as reduced use and waste of solvents should depend on the primary flow of the pumping system. On the other hand, the global dead volume of the system has to be minimized to use microbore columns. Namely, extra column band broadening could take place in the end fittings and joints, connecting tubing, air bubbles in the system, etc. [16,20].

The coupling microHPLC–microneb–ICPMS is an apparently interesting alternative to conventional HPLC–ICPMS. However, there are few papers published to date and the use of microbore columns has not yet been established as a routine methodology [1,19,20], as this is a subject that has been scarcely explored.

In the present work, the potential of microHPLC–ICPMS is investigated to check whether an improvement of sensitivity for mercury speciation could be attained. A method based on a methanol gradient to separate the most widely studied species (Hg(II) and MeHg^+) and also the less investigated species (EtHg^+ and PhHg^+) has been optimized. Composition of the mobile phase (mainly pH and percentage of methanol) and length of the reversed-phase microbore column have been the main separation parameters studied. In addition, a detailed study on the selection of nebulizer type and nebulizer gas flows has been also carried out. Finally, the

analytical methodology developed has been applied to spiked environmental water samples for method validation.

2. EXPERIMENTAL

2.1. Instrumentation

The microHPLC system consisted of an Agilent 1100 Series (Agilent, Waldbronn, Germany) binary pump, and auto injector with a programmable sample loop (20 μL maximum). Separations were performed on two Interchrom (Montluçon, France) reversed-phase microbore columns (150 mm \times 1 mm, 3 μm and 100 mm \times 1 mm, 3 μm).

The microbore column was connected to a Micro Mist, PFA-100 and Babington nebulizer via 30 cm of PEEK capillary tubing (0.125 mm i.d.). A Hewlett-Packard 4500 ICPMS (Yokogawa Analytical Systems, Tokyo, Japan) was used in this work and operational conditions are summarized in Table 1.

The “time resolved analysis” mode from HP4500 control software was used for microHPLC–ICPMS data acquisition.

The most abundant mercury isotope, ^{202}Hg was monitored in this study. The instrument was tuned at $m/z = 202$ using a continuously aspirated mercury solution (10 $\mu\text{g L}^{-1}$) containing 5% of methanol made up in double deionized water filtered through a 0.22 μm membrane. Before the LC system was coupled to ICPMS, HNO_3 1% was aspirated for 1 h in order to minimize the background signal due to the mercury memory effect [2].

2.2. Standards and reagents

$\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$, 1000 mg L^{-1} Hg (analytical reagent, a.r.) and $\text{C}_6\text{H}_5\text{HgI}$ (a.r.) were purchased from Baker (Deventer, Holland) and Fluka (Buchs, Switzerland), respectively. CH_3HgI and $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{HgCl}$ salts were obtained from Alfa Products (Johnson Matthey, Royston, Hertfordshire, UK) and were used without further purification. The stock standard solutions of methylmercury, ethylmercury and phenylmercury were prepared by dissolving the respective salts in HPLC-grade methanol (Baker), in acetonitrile (Scharlau)–methanol (3 + 20), and in acetonitrile–methanol (3 + 10), respectively. These solutions contained around 1000 mg L^{-1} Hg each and were preserved with 0.5% (v/v) HCl (a.r., Baker) [24] and maintained at 4 $^\circ\text{C}$ in amber-colored glass bottles. Appropriate dilutions of stock solutions were prepared daily by weight using double deionized water in order to obtain the required concentration.

Mobile phases were prepared from L-cysteine (Biochemika, Fluka), methanol and ammonium acetate (NH₄Ac) generated in situ from acetic acid (trace select, Baker) and ammonium hydroxide (trace select, Fluka). The pH was adjusted by adding HCl.

All the aqueous solutions were prepared with Nanopure II (Barnstead, MA, USA) (18.2 MΩ cm) water.

Table 1. Optimized operational conditions and gradient programme for microHPLC-ICPMS

ICPMS		HP 4500				
Forward power		1500 W				
Plasma gas flow		Ar, 15 L min ⁻¹				
Auxiliary gas flow		Ar, 1 L min ⁻¹				
Carrier gas flow		Ar, 0.49 L min ⁻¹				
Make up gas flow		Ar, 0.53 L min ⁻¹				
Sample depth		5.2 mm				
Monitoring masses		m/z = 202				
Acquisition mode		Time resolve analysis				
Integration time/mass		1 s				
Electron multiplier		– 1910 V				
Spray chamber		2 °C				
microHPLC system		Capillary HP1100				
Column		Interchrom ODB (100 mm x 1 mm, 3 µm)				
Flow-rate		70 µL min ⁻¹				
Injected volume		20 µL				
		Time (min)				
		0	3	12	12.1	15
Gradient programme						
% A	100	0	0	100	100	100
% B	0	100	100	0	0	0

Mobile phase A: 1% MeOH, 0.01 M NH₄Ac, 0.05% L-Cysteine, pH 3.0 with HCl; B: 10% MeOH, 0.1 M NH₄Ac, 0.5% L-Cysteine, pH 3.0 with HCl.

2.3. Method development

In a first step, the most suitable nebulizer was selected by taking into account its ability to aspirate the organic modifier with a minimum signal decreasing. Afterwards, isocratic injections of $10\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ of the individual mercury species were administered to investigate the chromatographic behavior. Then, an optimization of the chromatographic gradient and ICPMS parameters were carried out with a mixture of the mercury species at a concentration level of $10\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ each. Precision and detection limits were obtained in a spiked ($0.5\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$) surface water sample, filtered through a $0.22\text{ }\mu\text{m}$ pore diameter membrane and analyzed in sextuplicate. Accuracy was assessed by spiking ($n = 2$) groundwater, depurated urban wastewater and seawater samples at two concentration levels: 0.5 and $10\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$. Spiked solutions were prepared daily (by weight) by diluting the appropriate amount of mercury standards of $50\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ in a real water sample.

2.4. Recommended procedure

A $20\text{ }\mu\text{L}$ aliquot of a water sample filtered through a $0.22\text{ }\mu\text{m}$ pore diameter membrane is directly injected into the microHPLC–ICPMS system. Reversed-phase separation is carried out with a 100 mm length microbore column (1 mm i.d. , $3\text{ }\mu\text{m}$) by gradient elution (Table 1) using two mobile phases: A (0.05% L-cysteine, 1% MeOH, $0.01\text{ M NH}_4\text{Ac}$, pH 3.0) and B (0.5% L-cysteine, 10% MeOH, $0.1\text{ M NH}_4\text{Ac}$, pH 3.0) at a flow rate of $70\text{ }\mu\text{L min}^{-1}$. The outlet of the LC system is coupled to the ICPMS through Micromist nebulizer. Performance of the ICPMS (nebulizer flow rates) is checked daily and optimized (signal intensity and precision) by aspirating a $10\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ Hg solution in 5% methanol.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Optimization of micro-HPLC-ICPMS

The method applied in this work is based on the formation and subsequent chromatographic separation of metal–cysteine complexes by reversed-phase LC with ICPMS detection. In order to elute organometallic–cysteine complexes, the addition of an organic modifier was required. The amount of this organic modifier has a stronger effect on the retention time of PhHg^+ , the organomercury compound with the larger organic group. This is in agreement with Houk and co-workers [16], who employed acetonitrile as an organic modifier. On the other hand, two main problems were found to be associated with the use of an organic modifier: the impossibility to chromatographically resolve Hg(II) and MeHg^+ (the less retained species, only effectively separated at a low content of organic modifier), and the diminution of the peak areas

when the percentage of organic modifier increased, which is necessary for the elution of PhHg^+ . The signal decreasing could be explained since more solvent vapor reached the plasma [22].

3.1.1. Selection of the nebulizer and organic modifier

Interfacing microHPLC to ICPMS is a critical step, since the nebulizer type affects mass transport, especially when an organic modifier must be used, and nebulizer dead volume could decrease resolution. In this work, two micronebulizers, PFA-100 and Micromist, were compared to the classical Babington nebulizer (used here as a reference). A solution containing $50 \mu\text{g L}^{-1}$ Hg with variable amounts of acetonitrile was pumped at $100 \mu\text{L min}^{-1}$ and the respective signals were measured in order to check the effect of the organic modifier using the three different nebulizers. As Fig. 1 shows, the lowest sensitivity was found for the Babington type as expected, given its low mass transfer, with the signal decreasing close to zero for a 3% acetonitrile content. Using the two micronebulizers, a five-fold higher signal was achieved in the absence of acetonitrile, although a significant decrease was observed at low percentages of this modifier. Thus, PFA-100 counts decreased 15-fold when the acetonitrile concentration was raised to 3%, while these counts only decreased three-fold for the Micromist nebulizer. Hence, Micromist was used in subsequent experiments.

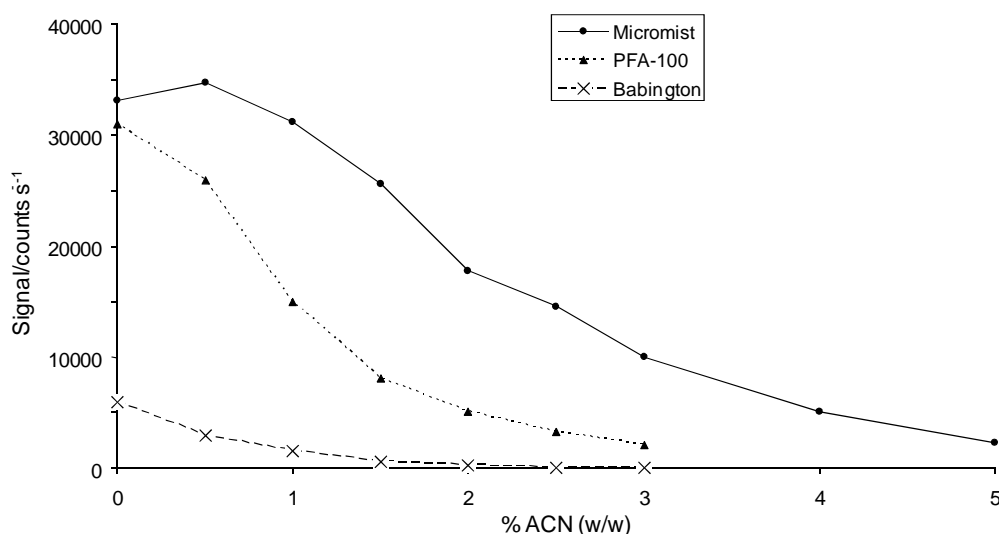


Figure 1. Average signal obtained with different nebulizers for a mercury solution with increasing concentrations of acetonitrile.

Afterwards, the most appropriate organic solvent to elute PhHg^+ (the species with the highest retention time) was searched. Two mobile phases, based on acetonitrile and methanol,

were pumped through the 150 mm microbore column. Sensitivities in 15% methanol and in 4% acetonitrile were similar. However, PhHg^+ eluted at around 9 min with the mobile phase containing 15% methanol, while more than 20 min were required for the other one. Consequently, methanol was used as the organic modifier in the following experiments.

3.1.2. Selection of mobile phase

Some parameters, mainly pH and organic modifier, were evaluated in order to achieve the maximum sensitivity, reproducibility and resolution with the minimum analysis time. For these experiments, mixed standard solutions containing $10 \mu\text{g L}^{-1}$ (as Hg) for each species were injected in the reversed-phase microbore column (150 mm \times 1 mm, 3 μm).

Changes in buffer concentration (NH_4Ac : 0.1–0.6 M) and complexing agent (L-cysteine: 0.5–1.5%, m/v) did not affect the chromatogram significantly. 0.1 M NH_4Ac and 0.5% (m/v) L-cysteine were selected to minimize not only the amount of dissolved salts in the mobile phase, but also the background noise and the baseline signal. It should be noted that no peaks were obtained in the absence of L-cysteine. These results could be explained by the adsorption of non-complexed mercury compounds in the stationary phase, which is apparently related with the interaction between positively-charged analytes and the free silanol groups of a silica-based reversed-phase packing [25].

In relation to pH, mobile phases with a pH ranging from 3.0 to 5.7 were prepared to evaluate its effect on retention times. As shown in Fig. 2, the pH of the mobile phase caused a slight, but not significant, decrease on the retention time of Hg(II) , MeHg^+ and EtHg^+ . These results are in agreement with those previously reported by Wan et al. [14]. However, the elution time for the PhHg^+ , a species not analyzed by Wan, notably decreased at a low pH. Decreasing the retention time for all species with the pH diminution might be attributed to the acid–base properties of the L-cysteine, the complexing agent, although the reason remains unclear. Some explanation could be hypothesized: after the formation of the stable complex between L-cysteine and Hg by the formation of Hg–SR bond, the deprotonated carboxylate group of cysteine can self-interact with the Hg atom of the complex at higher pH generating a six-member ring compound. Subsequently, hydrophobic interactions of analytes with the stationary phase could be enhanced increasing in this way the retention time. As the pH decreases, protonation of carboxylic group becomes significant and the self-interaction with Hg may eventually disappear. The open structure generated can be considered more accessible to water and, in this new conditions, hydrophobic interactions with stationary phase becomes less significant. Thus,

retention time would decrease with pH lowering, and the effect is more intense for the more retained compound.

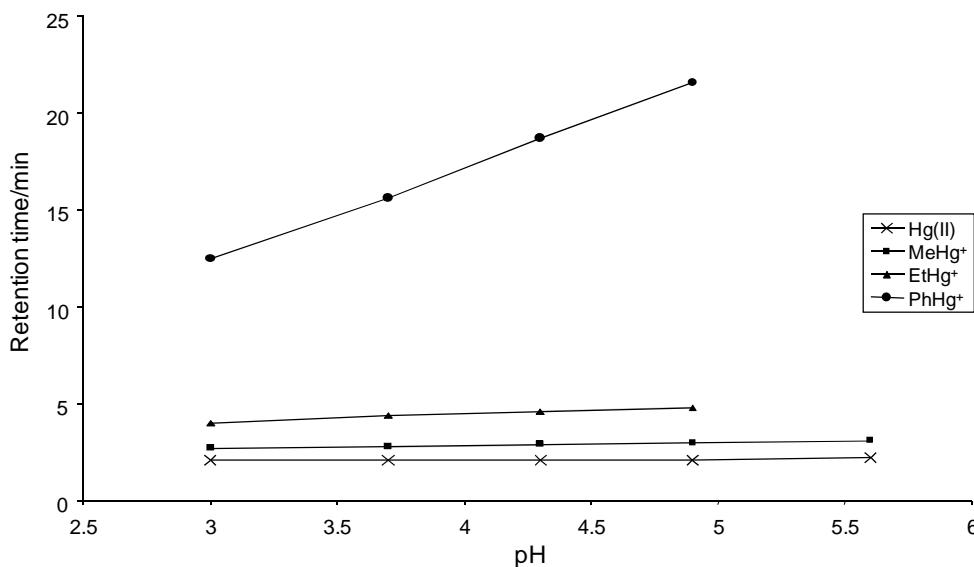


Figure 2. Effect of pH on retention time. Each mercury species was present at $10 \mu\text{g L}^{-1}$. A mobile phase containing 5 % of methanol was pumped through the microHPLC-ICPMS.

This hypothesis should, however, be proved, and further experiments will be needed. A pH of 3.0 was chosen as optimum, since lower values were not checked as they could damage the silica-based column.

Finally, the effect of methanol content (5, 10 and 15%, w/v) was checked. None of the content assayed was regarded satisfactory with the 150 mm column. An increasing percentage of methanol decreases retention time (mainly for PhHg^+), but also causes a two- to three-fold reduction in the peak areas.

A shorter column (100 mm), together with gradient elution (Table 1) was necessary to avoid coelution of Hg(II) and MeHg^+ , and to elute PhHg^+ at around 12 min with appropriate sensitivity.

Two mobile phases with different percentages of methanol (A 1% and B 10%) were used according to the following time program (Table 1): from 0 to 3 min methanol content increased from 1 to 10%; from 3 to 11.9 min, 10% methanol; and from 12 min, 1% methanol. Fig. 3d shows the chromatogram (solid line) obtained for a $10 \mu\text{g L}^{-1}$ of each mercury species and the methanol gradient (dashed line) reaching the plasma, where the dwell and dead volumes of the system

have been taken into account (around 2.5 min delay). The first step of the gradient program (3 min) was enough to achieve baseline resolution of Hg(II) and MeHg⁺.

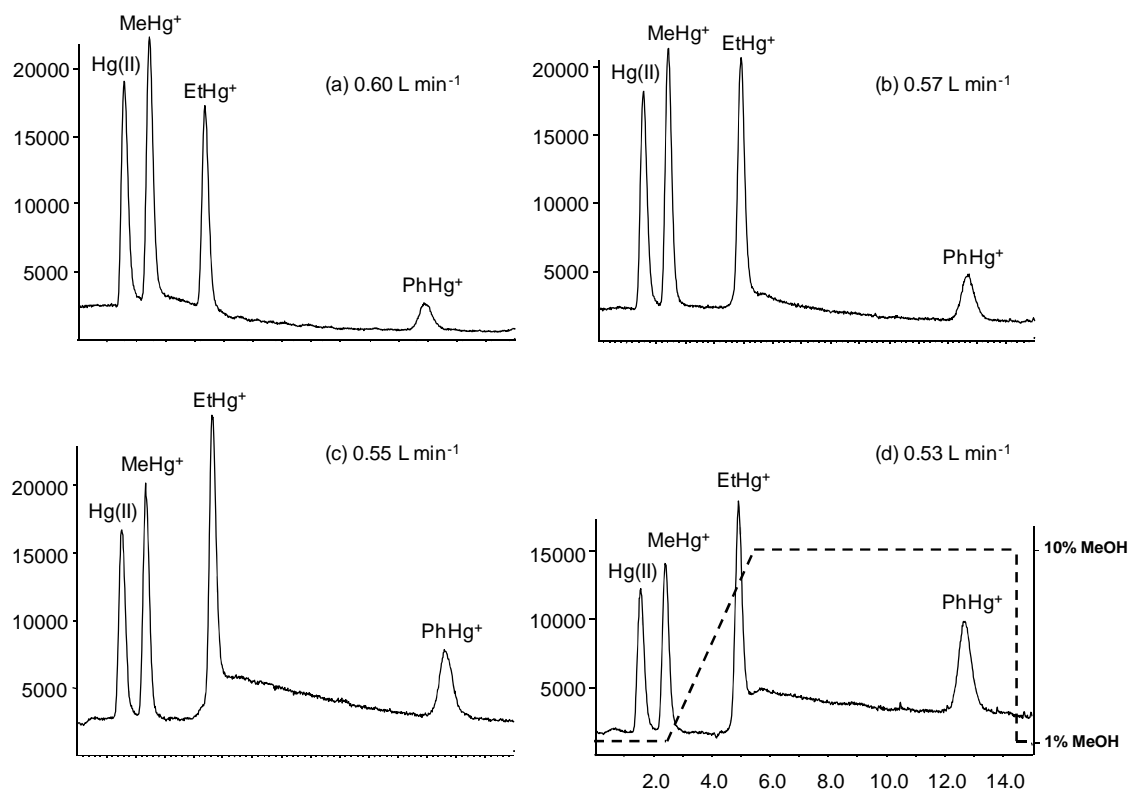


Figure 3. (a-d) Effect of the make up gas flow rate on the chromatographic signals. MicroHPLC-ICPMS separation of mercury compounds using the gradient programme (see text). 10 µg L⁻¹ of each mercury species was injected, injection volume 5 µL. Dotted line shows percentage of methanol reaching nebulization step and plasma calculated considering the dwell and dead volumes of the system (2.5 min delayed).

Subsequently, an increase in methanol concentration to 10%, led to retention times for EtHg⁺ and PhHg⁺ of 4.8 and 12.5 min, respectively. The column was ready for the following injection after the final step of the gradient program (total analysis time, 15 min).

The baseline increment at around 5 min, that overlaps EtHg⁺ peak, was related to the Hg contamination of reagents together with the effect of the increased methanol content which reached the nebulizer and the plasma.

Elimination of baseline fluctuations was required to obtain significantly different analyte signals from the background at concentrations below 1 ppb. To this aim, optimization of the

nebulizer system appeared as a key parameter. Testing the baseline noise and signal due to Hg contamination of reagents was also required.

3.1.3. Improvement of signal to noise ratio (S/N)

Several strategies were followed to improve the sensitivity of the method in order to reach LODs below $0.1 \mu\text{g L}^{-1}$.

Firstly, the nebulization system as a critical part of the coupling was optimized. For a constant value of carrier gas flow rate (0.49 L min^{-1}), a make up gas flow was seen to be critical. Fig. 3 shows the different effect that a make up gas flow induces on the signals of Hg(II) and MeHg⁺ (the species eluted with 1% methanol), EtHg⁺ and PhHg⁺ (those eluted with 10% methanol) and on the baseline. Higher values of make up gas flow rate (0.6 L min^{-1}) bring about the highest S/N for Hg(II) and MeHg⁺ as well as a flat baseline. Lower flow rates (0.53 L min^{-1}) enhance S/N for EtHg⁺ and PhHg⁺, but considerable baseline fluctuations are observed when 10% methanol arrives at nebulization system (see the drift at around 5 min and the methanol gradient concentration reaching the nebulizer and plasma as seen in Fig. 3).

It would appear that an increase in the make up flow rate improves the aerosol transport, allowing more analyte to be transported to the detector. However, a larger efficiency in mass transport also results in a greater quantity of methanol reaching and destabilizing the plasma. For this reason, the optimum make up flow for 10% methanol was lower. Therefore, an accurate optimization of nebulizer system and plasma conditions is necessary. A $10 \mu\text{g L}^{-1}$ mercury solution containing 5% methanol (as a compromise between the two mobile phases) was finally selected, to check the best nebulizer flow rates prior to the coupling on a daily basis.

As found in the literature however, trace mercury contamination of reagents [13,14] significantly affects background and noise of LC chromatograms. In the present work, background signal were found to depend on the lot of cysteine. Mercury content (not reported on the label) randomly varied between reagent bottles and caused different baseline levels and noises. Fig. 4 shows the chromatogram obtained when two lots of L-cysteine were used. Consequently, a careful testing of the chelating reagent lot should be performed before mobile phase preparation in order to obtain higher S/N at low concentrations ($<1 \mu\text{g L}^{-1}$).

Finally, the injection volume was raised from $5 \mu\text{L}$ (usual in microbore HPLC) to $20 \mu\text{L}$. A four-fold increase in peak area was obtained while peak shape or resolution were not significantly worse.

It should be noted that other columns with a different functionalization might allow the elution of PhHg^+ with a lower methanol content as well as a separation in isocratic conditions, which thus leads to stable plasma ionization with better signal-to-noise ratios and background, and to methods with lower detection limits.

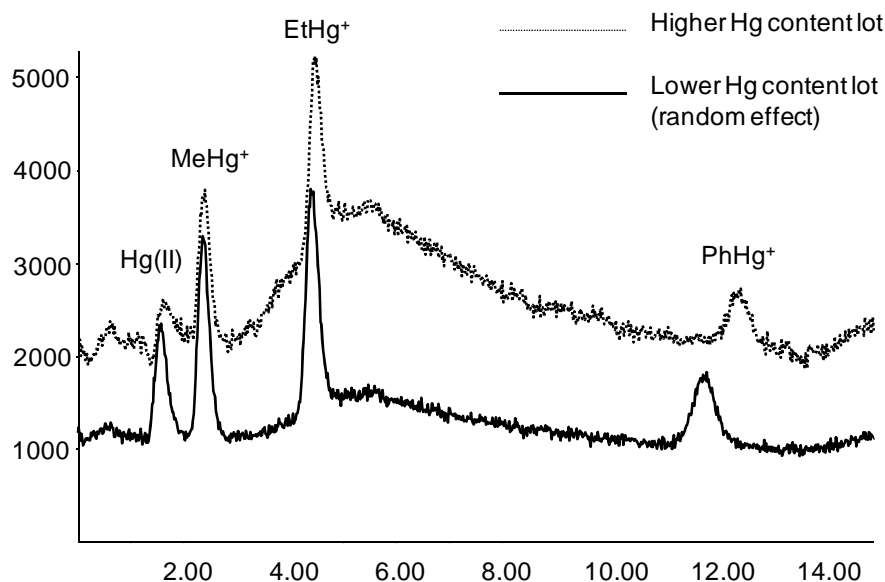


Figure 4. Chromatogram of the four mercury compounds ($1 \mu\text{g L}^{-1}$ of each mercury species, injection volume $5 \mu\text{L}$) showing the effect of different lots of complexing agent on baseline level and S/N.

3.2. Analytical figures of merit

Precision and detection limits of the microHPLC–ICPMS method developed were evaluated on a surface filtered water sample ($0.22 \mu\text{m}$) and spiked with $0.5 \mu\text{g L}^{-1}$ (as Hg) of each species (Fig. 5).

Precision ($n = 6$) for all species varied from 0.5 to 2.1% R.S.D. and was usual for this kind of matrix. The detection limit, defined as three times the standard deviation of the fortified concentration ($n = 6$), ranged from 8 ng L^{-1} for EtHg^+ to 32 ng L^{-1} for PhHg^+ and was noticeably lower than most of the previous LC-based methods (Table 2). Linearity was tested from 0.1 to $10 \mu\text{g L}^{-1}$ and provided correlation coefficients around 0.999. Accuracy was assessed by spiking (two levels: 0.5 and $10 \mu\text{g L}^{-1}$) three environmental waters ($n = 2$): groundwater, depurated urban wastewater and seawater. Recoveries varied from 85 to 105% (Table 3) for the two levels assayed in groundwater. When depurated water (with a conductivity of $7500 \mu\text{S cm}^{-1}$) was analyzed recovery for Hg(II) (eluted near the dead volume) decreases to 50% or below. Decrease in

recovery can also be observed in seawater ($>25,000 \mu\text{S cm}^{-1}$) for all species with the exception of PhHg^+ at the higher concentration assayed ($10 \mu\text{g L}^{-1}$). The low recovery found in high saline samples (due to plasma ionization power decreasing) leads to matrix elimination before analysis. It should be noted that $0.18 \mu\text{g L}^{-1}$ of PhHg^+ were found for the groundwater analyzed. This result supports the need to also develop methods for species other than Hg(II) and MeHg^+ .

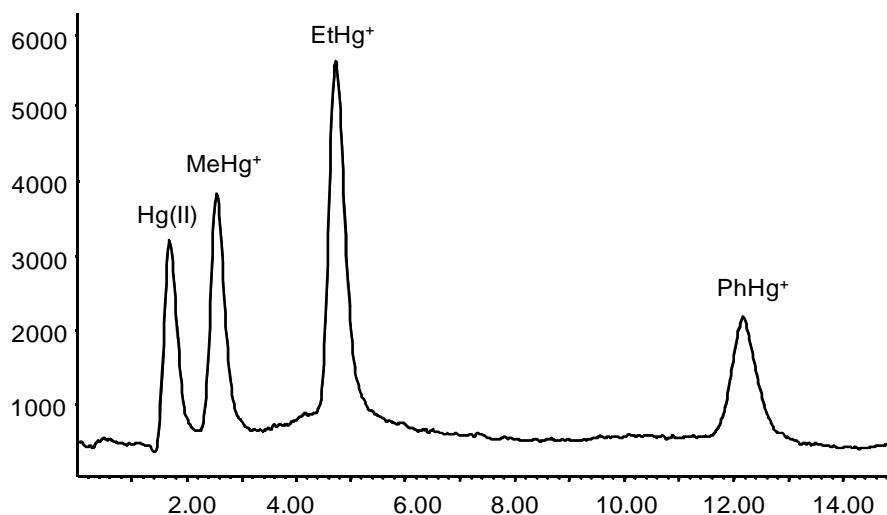


Figure 5. Chromatogram of a surface water sample spiked with $0.5 \mu\text{g L}^{-1}$ (as Hg) of each species. Injection volume $20 \mu\text{L}$. See completely chromatographic conditions in the text

Regarding detection limits, other methods based on atomic fluorescence detection [12,13], as a sensitive detection system for mercury, showed a lower sensitivity, probably owing to a decrease of S/N caused by (photo)chemical steps needed to generate atomic vapor without quenching the fluorescence of Hg. An early work [16] was based on micro LC coupled to ICPMS through a direct injection nebulizer (DIN). This nebulizer produces a very fine and stable aerosol directly to the plasma. However, the large percentage of organic solvent used in the mobile phase (20% acetonitrile) should destabilize the plasma, increase the noise and preclude the determination at very low Hg concentrations, achieving LOD of around 4000 ng L^{-1} . Substantially lower detection limits (around 5 ng L^{-1}) have been reported for the LC-ICPMS method by Martinez Blanco et al. [17] after a preconcentration step (100:1), although EtHg^+ and PhHg^+ were not analyzed. No methanol was needed, therefore no degradation of signal was obtained given the use of the organic modifier. Despite the more favourable plasma conditions LOD's from the direct method, without the preconcentration step, were around 500 ng L^{-1} which are notably higher than those obtained in the present work (below 30 ng L^{-1}).

Table 2. Comparison of some HPLC-based methods for mercury speciation from previous works

Instrumental equipment	Injection volume (μL)	LOD	Hg	MeHg	EtHg	PhHg	Reference
HPLC-CVGAFS	35	Absolute (pg)	16	18	18	20	[12]
		Relative (ng L ⁻¹) ^a	457	514	514	571	
HPLC-PCOCVAFS	200	Absolute (pg)	10	10	nr	nr	[13]
		Relative (ng L ⁻¹) ^a	50	50	nr	nr	
microHPLC-(DIN)ICPMS	2	Absolute (pg)	nr	7	7	6	[16]
		Relative (ng L ⁻¹)	nr	4000	4000	3000	
HPLC-ICPMS	100	Absolute (pg) ^a	52	56	nr	nr	[17]
		Relative (ng L ⁻¹) ^b	5.2	5.6	nr	nr	
microHPLC-ICPMS	20	Absolute (pg)	0.22	0.46	0.18	0.7	This work
		Relative (ng L ⁻¹)	11	23	8	32	

PCO, photochemical oxidation

^a Calculated, by authors of the present work, taking into account the injection volume.

^b After a preconcentration step 100:1. Without preconcentration the relative LOD's are 520 and 560 ng L⁻¹.

Table 3. Accuracy assessment

Compound	Added	Groundwater		Depurated		Seawater	
		Found	Recovery (%)	Found	Recovery (%)	Found	Recovery (%)
Hg	0.5	0.48	96.9	0.26	52.4	0.24	48.6
MeHg	0.5	0.51	101.9	0.51	102.6	0.32	63.7
EtHg	0.5	0.51	102.5	0.47	93.8	0.38	76.2
PhHg	0.5	0.66	95.9 ^a	0.44	87.2	0.36	71.1
Hg	10	8.47	84.7	4.01	40.1	4.37	43.7
MeHg	10	10.31	103.1	8.77	87.7	5.24	52.4
EtHg	10	8.54	85.4	8.99	89.9	7.13	71.3
PhHg	10	9.84	96.6 ^a	9.39	93.9	9.84	98.4

Recoveries calculated in spiked groundwater, depurated urban wastewater and seawater. Concentration of mercury species (added and found) are expressed in $\mu\text{g L}^{-1}$.

^a Recovery obtained taken into account the concentration found in the blank sample ($0.18 \mu\text{g L}^{-1}$).

The method developed in this work is robust and sensitive, despite the methanol gradient used that continuously modifies nebulization step and destabilizes the plasma. The use of a Micromist nebulizer, with an accurate optimization of gas flows (carrier and make up), together with the microLC system are regarded as the key parameters.

Regarding chromatographic features found in the present work, peak widths (from 30 s to 1 min) are similar to those obtained with normal bore HPLC [12,13,17]. Those unexpected large peak widths for microbore HPLC were also obtained by Houk et al. [16], who explained the width based on memory effect of mercury in the nebulizer and column. However, the peak widths dependence on ion pairing reagent and the percentage of organic modifier [16] indicates that column performance should also to be tested. Perhaps, the use of new C18 stationary phases, together with an accurate optimisation of the chromatographic separation, generates the expected narrow peak widths for microbore columns. These widths are an important parameter for baseline resolution between Hg(II) and MeHg⁺ and are currently under study for different concentration ratios Hg/MeHg.

4. CONCLUSIONS

The potential of microHPLC–ICPMS in mercury speciation has been investigated in this paper. This combination has allowed the simultaneous determination of Hg(II), MeHg⁺, EtHg⁺ and PhHg⁺ in water at a very low concentration (LOD's below 0.03 µg L⁻¹), using L-cysteine as an Hg complexing agent, and methanol gradient elution, at pH 3.0.

Compared to conventional HPLC–ICPMS, the application of microflows reduces the amount of solvent introduced into the ICP, thus improving the method sensitivity as the use of an organic modifier decreases the ionization power of the plasma.

One instrumental key factor has been the optimization of the nebulization system (carrier and make up gas flows) in order to obtain the nebulization of the methanol gradient elution with good mass transport efficiency, a low organic solvent loading into the plasma and good precision.

Another important factor has been the purity of reagents, especially the Hg content of the complexing agent L-cysteine. Traces of Hg as a contaminant varied vastly with the lot number of that reagent. Thus, a worsening of the S/N ratio due to contamination becomes more significant at a low concentration of analyte as it prevents the analysis of Hg species with a suitable sensitivity.

The results expected after using the microHPLC–microneb–ICPMS system have been partially accomplished. The claimed very thin chromatographic peaks have not actually been obtained, which might be accounted for by the large dead volume of the double pass spray chamber utilized, by the injection volume (20 μ L) used to improve sensitivity (maybe too high for the microbore column used) and also by the HPLC column performance itself.

The sensitivity obtained, although better than with conventional HPLC, has been lower than that expected for this coupling. This might be a result of an insufficient mass transport and desolvation of the nebulization system used. At present, different nebulizers with, a priori, higher efficiency, together with distinct spray chambers (with lower dead volumes) are currently under study. In addition, columns with modified C18 stationary phases (different performances) are being studied in order to permit a lower organic content in the mobile phase to elute PhHg^+ , and to possibly conduct separation in isocratic conditions. Finally, matrix effect (owing to saline content) minimization is also under study.

Thus, microHPLC–ICPMS has been found to be less sensitive and presented wider chromatographic peaks than expected. Despite this fact, the direct coupling of microLC to ICPMS through a Micromist nebulizer permits the sensitive determination of the four Hg species in environmental water by direct injection of the sample, i.e. without any sample pretreatment. This fact minimizes certain difficulties and errors associated with sample manipulation and derivatization steps.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was partially supported by Generalitat Valenciana through the research project GV05/120. ICP–MS measurements were made at the Servei Central d'Instrumentació Científica (SCIC), Universitat Jaume I. We would like to thank Dr. F. Hernández for their useful comments and help.

REFERENCES

- [1] J.E. Sánchez Uría, A. Sanz-Medel, *Talanta* 47 (1998) 509–524.
- [2] M.J. Bloxham, A. Gachanja, S.J. Hill, P.J. Worsfold, *J. Anal. Atom. Spectrom.* 11 (1996) 145–148.
- [3] L.R. Bravo-Sánchez, J. Ruiz Encinar, J.I. Fidalgo Martínez, A. Sanz-Medel, *Spectrochim. Acta Part B* 59 (2004) 59–66.
- [4] Global Mercury Assessment, UNEP Chemicals, Geneva, December 2002.

- [5] P. Krystek, R. Ritsema, *Appl. Organometal. Chem.* 18 (2004) 640–645.
- [6] T. Stoichev, R.C. Rodriguez Martin-Doimeadios, E. Tessier, D. Amouroux, O.F.X. Donard, *Talanta* 62 (2004) 433–438.
- [7] J.L. Gómez-Ariza, F. Lorenzo, T. García-Barrera, D. Sánchez-Rodas, *Anal. Chim. Acta* 511 (2004) 165–173.
- [8] G. Centineo, E. Blanco González, A. Sanz-Medel, *J. Chromatogr. A* 1034 (2004) 191–197.
- [9] J. Muñoz, M. Gallego, M. Valcárcel, *J. Chromatogr. A* 1055 (2004) 185–190.
- [10] Y.-S. Ho, P.C. Uden, *J. Chromatogr. A* 688 (1994) 107–116.
- [11] C. Sarzanini, G. Sacchero, M. Aceto, O. Abollino, E. Mentasti, *Anal. Chim. Acta* 284 (1994) 661–667.
- [12] E. Bramante, C. Lomonte, M. Onor, R. Zamboni, A. D'Ulivo, G. Raspi, *Talanta* 66 (2005) 762–768.
- [13] E. Ramalhosa, S. Río Segade, E. Pereira, C. Vale, A. Duarte, *Anal. Chim. Acta* 448 (2001) 135–143.
- [14] C. Wan, C. Chen, S. Jiang, *J. Anal. At. Spectrom.* 12 (1997) 683–687.
- [15] K.L. Ackley, K.L. Sutton, J.A. Caruso, *J. Anal. At. Spectrom.* 15 (2000) 1069–1073.
- [16] S.C.K. Shum, H. Pang, R.S. Houk, *Anal. Chem.* 64 (1992) 2444–2450.
- [17] R. Martinez Blanco, M. Tagle Villanueva, J.E. Sánchez Uría, A. Sanz-Medel, *Anal. Chim. Acta* 419 (2000) 137–144.
- [18] L. Dong, X. Yan, Y. Li, Y. Jiang, S. Wang, D. Jiang, *J. Chromatogr. A* 1036 (2004) 119–125.
- [19] C.F. Harrington, *Trends Anal. Chem.* 19 (2000) 167–179.
- [20] H. Garraud, A. Woller, P. Fodor, O.F.X. Donard *Analisis* 25 (1997) 25–31.
- [21] S.E. Maestre, J.L. Todolí, J.M. Mermet, *Anal. Bioanal. Chem.* 379 (2004) 888–899.
- [22] A. Seubert, *Trends Anal. Chem.* 20 (2001) 274–287.
- [23] J.L. Todolí, J.M. Mermet, *Trends Anal. Chem.* 24 (2005) 107–116.
- [24] J.L. Parker, N.S. Bloom, *Sci. Total Environ.* 337 (2005) 253–263.
- [25] U.D. Neue, K. Van Tran, A. Méndez, P.W. Carr, *J. Chromatogr. A* 1063 (2005) 35–45.

3.3. APLICACIÓN DEL MÉTODO DE ESPECIACIÓN DESARROLLADO AL ESTUDIO DE LA PRESENCIA DE Hg EN EL ACUÍFERO DE LA PLANA DE CASTELLÓN

Tal y como se ha reseñado en el capítulo anterior, se ha llevado a cabo un estudio preliminar sobre la presencia de distintas especies organometálicas en el acuífero de la Plana de Castellón, que tenía como principal objetivo establecer una red de vigilancia sobre la evolución de la concentración de estos compuestos. En el caso del mercurio, las especies monitorizadas fueron Hg(II), MeHg, EtHg y PhHg, utilizando para ello el método de separación de micro-cromatografía líquida de fase inversa que se acaba de describir en el **artículo científico 4**.

Las muestras analizadas, procedentes de los mismos pozos que se muestrearon para el arsénico y selenio, así como su localización están recogidas en la Tabla 2.1 y la Figura 2.1 (ver capítulo 2). Como se puede observar en la Tabla 3.1, la presencia de compuestos organomercúricos puede considerarse puntual. El metilmercurio, ha sido detectado sólo en cinco de las aguas (A10, AB1, V9, V15 y AN1), y siempre a un nivel de concentración igual o menor de 0.03 ppb. Cabe señalar que este compuesto ha aparecido siempre en una proporción aproximada de 1:10 respecto al mercurio inorgánico. El etilmercurio y fenilmercurio han sido detectados sólo en dos muestras (diferentes para cada especie). En el caso del positivo en fenilmercurio, la concentración hallada fue de 0.95 ppb (cinco veces superior al Hg inorgánico) en la muestra V7. Esta muestra es interesante desde el punto de vista del origen de la contaminación, puesto que se considera que el fenilmercurio es producto exclusivamente de la actividad humana. Por lo tanto, habría que insistir en el control de esta muestra en particular.

De nuevo, hay que remarcar que para evaluar convenientemente la calidad del agua del acuífero es imprescindible conocer la variabilidad temporal de las concentraciones obtenidas, así como analizar otro tipo de muestras (aguas residuales, fangos...). Por ello, el uso de métodos basados en microHPLC-ICP-MS, que reducen significativamente el tiempo de análisis, aparece como una interesante alternativa a los métodos convencionales.

Tabla 2.2. Concentración de las especies de Hg encontrada en las muestras de agua analizadas

Etiqueta	Hg(III)/ $\mu\text{g L}^{-1}$	MeHg/ $\mu\text{g L}^{-1}$	EtHg/ $\mu\text{g L}^{-1}$	PhHg/ $\mu\text{g L}^{-1}$
V1	0.09	nd	nd	nd
V2	0.18	nd	nd	nd
V3	0.79	nd	nd	nd
V4	0.78	nd	nd	nd
V5	nd	nd	nd	nd
V6	0.13	nd	nd	nd
V7	0.18	nd	nd	0.95
V8	0.84	nd	0.08	nd
V9	0.11	0.03	nd	nd
V10	nd	nd	nd	nd
V11	nd	nd	nd	nd
V12	0.09	nd	nd	nd
V13	nd	nd	nd	0.06
V14	0.10	nd	nd	nd
V15	0.27	nd	nd	nd
V16	0.08	0.02	nd	nd
V17	0.59	nd	nd	nd
V18	0.22	nd	nd	nd
V19	0.67	nd	nd	nd
AV1	nd	nd	nd	nd
AV2	nd	nd	nd	nd
AV3	nd	nd	nd	nd
AV4	0.13	nd	nd	nd
X1	0.07	nd	nd	nd
X2	1.00	nd	nd	nd
X3	0.20	nd	nd	nd
AX1	0.06	nd	nd	nd
AX2	0.06	nd	nd	nd
AX3	0.05	nd	nd	nd

Tabla 2.2. (continuación)

A1	nd	nd	nd	nd
A2	nd	nd	nd	nd
A3	nd	nd	nd	nd
A4	nd	nd	nd	nd
A5	nd	nd	nd	nd
A6	nd	nd	nd	nd
A7	nd	nd	nd	nd
A8	nd	nd	nd	nd
A9	nd	nd	nd	nd
A10	0.08	0.02	0.02	nd
AN1	0.30	0.02	nd	nd
AN2	nd	nd	nd	nd
AB1	0.09	0.01	nd	nd
AB2	1.36	nd	nd	nd
L1	0.08	nd	nd	nd
AE1	0.29	nd	nd	nd

3.4. DETERMINACIÓN DE Hg(II) Y MeHg EN TEJIDOS DE PESCADO MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS MOLECULAR Y DILUCIÓN ISOTÓPICA ESPECÍFICA

Como se ha comentado anteriormente, el mercurio está considerado como un elemento altamente tóxico, especialmente cuando se encuentra en forma de MeHg. Este compuesto es liberado al medio como consecuencia de varias actividades antropogénicas así como por la metilación de Hg(II) en entornos acuáticos. Allí entra en la cadena trófica de diferentes organismos marinos, pudiéndose biomagnificar en peces predadores en un factor de 10^5 - 10^7 , lo que incrementa peligrosamente su concentración.¹ En consecuencia, el consumo de pescado supone uno de los mayores riesgos de contaminación de mercurio para los humanos, por lo que se han emitido diferentes directivas que regulan los niveles de estos compuestos en diferentes productos alimentarios de origen marino. Sin embargo, la determinación de Hg(II) y MeHg en matrices complejas no es tarea fácil,² ya que durante las etapas de preparación de muestra y separación suelen producirse reacciones de metilación y desmetilación que conducen a resultados erróneos.^{3,4} Por lo tanto, el desarrollo de una metodología de rutina rápida, económica y fiable, capaz de corregir estos procesos, sería sin duda muy bien acogida por muchos laboratorios de análisis.

El uso del análisis por dilución isotópica en la modalidad de trazadores múltiples permite cuantificar la extensión tanto de la metilación como de la desmetilación, proporcionando la concentración exacta de Hg(II) y MeHg.⁵ Para este propósito, se añaden a la muestra ambos compuestos enriquecidos en un isótopo distinto y se equilibran con los compuestos endógenos antes de que tenga lugar ninguna reacción de transformación. En los últimos años se han publicado varios trabajos para aguas, sedimentos y tejidos biológicos que emplean más de un trazador.⁶ Todos estos métodos hacen uso de una técnica de separación cromatográfica, principalmente GC, acoplada a ICP-MS. No obstante, el elevado coste del ICP-MS (en términos de adquisición y mantenimiento) así como la necesidad de personal altamente cualificado hace que este acoplamiento no sea el más adecuado en laboratorios de ensayo. En cambio, el uso de la instrumentación GC-EI-MS, más económica, menos

sofisticada y ampliamente extendida, aparece como una prometedora alternativa para llevar a cabo análisis de rutina por dilución isotópica en la modalidad de trazadores múltiples. Sin embargo, al tratarse de una técnica molecular, se complica de manera notable la medida de las relaciones isotópicas elementales, debido a que éstas se combinan con las relaciones isotópicas del C, H, N, O... presentes en los ligandos del metal. Además, la coelución de otros compuestos orgánicos puede generar iones interferentes. Por consiguiente, para obtener resultados exactos es necesario utilizar ecuaciones matemáticas que corrijan estas contribuciones, así como aplicar etapas de purificación al final de la preparación de la muestra.^{7,8} Hasta ahora, todos los métodos basados en el análisis por dilución isotópica con GC-El-MS emplean un solo trazador, por lo que no serían capaces de corregir las interconversiones de especies derivadas de la determinación de Hg(II) y MeHg en muestras sólidas.

La deconvolución de perfiles isotópicos (IPD) es un procedimiento de cálculo que consiste en descomponer el perfil isotópico medido, resultante de la mezcla de varios compuestos, en sus componentes originales mediante regresión lineal multivariante.⁹ Aunque inicialmente su uso se limitó a la evaluación de la pureza espectral,^{9,10} en los últimos años se ha aplicado también al análisis por dilución isotópica.^{11,12} De este modo, la cantidad de cada especie en la mezcla (después de que tengan lugar los procesos de transformación) se expresa como una combinación lineal de los perfiles isotópicos del compuesto endógeno natural y el enriquecido, siendo la contribución de cada uno de ellos equivalente a sus fracciones molares. A diferencia del análisis por dilución isotópica tradicional, este procedimiento permite establecer un mayor número de ecuaciones que incógnitas, lo cual puede ser aprovechado para corregir las impurezas espectrales que interfieren con los *clusters* iónicos seleccionados. En efecto, la fuente de ionización electrónica del GC-MS puede generar varios iones con diferente número de átomos de hidrógeno que al solaparse originan un perfil isotópico diferente al esperado, por lo que deben ser corregidos.¹³ En consecuencia, el uso de IPD sitúa el acoplamiento GC-El-MS como una alternativa más asequible que GC-ICP-MS.

En el presente trabajo, se pretende demostrar la aplicabilidad de la dilución isotópica con doble trazador a GC-El-MS para determinar Hg(II) y MeHg en tejidos de

pescado, así como cuantificar los procesos de interconversión producidos durante el tratamiento de muestra. Para ello, las muestras fueron fortificadas con mercurio inorgánico enriquecido en ^{199}Hg y metilmercurio enriquecido en ^{201}Hg antes de la extracción. Como las disoluciones de trazador pueden contener impurezas de la otra especie, se desarrollaron nuevas ecuaciones basadas en IPD para tenerlas en cuenta. Así, el número total de moles de Hg(II) y MeHg en la mezcla inicial $N_{m_0}^{\text{IHg}}$ y $N_{m_0}^{\text{MeHg}}$, respectivamente, se puede expresar de la siguiente forma:

$$N_{m_0}^{\text{IHg}} = N_s^{\text{IHg}} + N_{t1}^{\text{IHg}} + N_{t2}^{\text{IHg}} \quad (1)$$

y

$$N_{m_0}^{\text{MeHg}} = N_s^{\text{MeHg}} + N_{t1}^{\text{MeHg}} + N_{t2}^{\text{MeHg}} \quad (2)$$

donde s indica el perfil isotópico del Hg natural, $t1$ el del marcador enriquecido con ^{199}Hg y $t2$ el del enriquecido con ^{201}Hg . Como se puede observar, en los balances se han incluido N_{t2}^{IHg} y N_{t1}^{MeHg} , es decir, las impurezas de Hg(II) y MeHg de los trazadores.

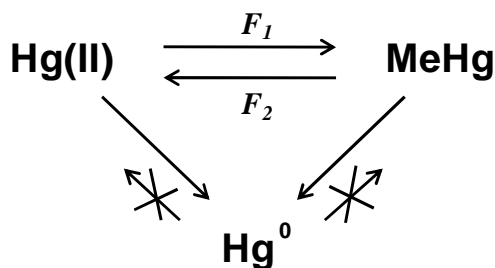


Figura 3.3. Posibles vías de interconversión de los compuestos de mercurio estudiados.

Tal y como se ilustra en la Figura 3.3, durante el análisis pueden darse diferentes reacciones de transformación. Asumiendo que el equilibrio isotópico se alcance antes de que tengan lugar estos procesos, los compuestos endógenos y marcados se interconvertirán en la misma extensión. Cabe señalar que la reducción de Hg(II) y MeHg a Hg^0 es un proceso irreversible que, como cualquier pérdida de analito, queda corregido con el uso de la dilución isotópica, sin necesidad de plantear ningún factor

de interconversión adicional. Por tanto, los balances molares se modificarían de la siguiente forma:

$$N_m^{IHg} = (N_s^{IHg} + N_{t1}^{IHg} + N_{t2}^{IHg})(1 - F_1) + (N_s^{MeHg} + N_{t1}^{MeHg} + N_{t2}^{MeHg})F_2 \quad (3)$$

y

$$N_m^{MeHg} = (N_s^{MeHg} + N_{t1}^{MeHg} + N_{t2}^{MeHg})(1 - F_2) + (N_s^{IHg} + N_{t1}^{IHg} + N_{t2}^{IHg})F_1 \quad (4)$$

Teniendo en cuenta que la cantidad de Hg de cada perfil isotópico en los picos de Hg(II) y MeHg se puede relacionar con sus correspondientes fracciones molares (x_s , x_{t1} , y x_{t2}), se deducen las siguientes expresiones:

$$N_m^{IHg} x_s^{IHg} = N_s^{IHg}(1 - F_1) + N_s^{MeHg} F_2 \quad (5)$$

$$N_m^{IHg} x_{t1}^{IHg} = N_{t1}^{IHg}(1 - F_1) + N_{t1}^{MeHg} F_2 \quad (6)$$

$$N_m^{IHg} x_{t2}^{IHg} = N_{t2}^{IHg}(1 - F_1) + N_{t2}^{MeHg} F_2 \quad (7)$$

$$N_m^{MeHg} x_s^{MeHg} = N_s^{MeHg}(1 - F_2) + N_s^{IHg} F_1 \quad (8)$$

$$N_m^{MeHg} x_{t1}^{MeHg} = N_{t1}^{MeHg}(1 - F_2) + N_{t1}^{IHg} F_1 \quad (9)$$

$$N_m^{MeHg} x_{t2}^{MeHg} = N_{t2}^{MeHg}(1 - F_2) + N_{t2}^{IHg} F_1 \quad (10)$$

Basándonos en el desarrollo matemático descrito en el capítulo 1, si se utiliza tetrapropil borato de sodio como derivatizante y se monitorizan en el GC-El-MS (SIM) los iones moleculares resultantes ($HgPr_2^+$ y $MeHgPr^+$), podemos establecer el siguiente sistema de ecuaciones para cada compuesto:

$$\begin{bmatrix} A_m^{284} \\ A_m^{285} \\ A_m^{286} \\ A_m^{287} \\ A_m^{288} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} A_s^{284} & A_{t1}^{284} & A_{t2}^{284} \\ A_s^{285} & A_{t1}^{285} & A_{t2}^{285} \\ A_s^{286} & A_{t1}^{286} & A_{t2}^{286} \\ A_s^{287} & A_{t1}^{287} & A_{t2}^{287} \\ A_s^{288} & A_{t1}^{288} & A_{t2}^{288} \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} x_s^{IHg} \\ x_{t1}^{IHg} \\ x_{t2}^{IHg} \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} e^{284} \\ e^{285} \\ e^{286} \\ e^{287} \\ e^{288} \end{bmatrix} \quad (11)$$

para el pico propilado de Hg(II) y

$$\begin{bmatrix} A_m^{256} \\ A_m^{257} \\ A_m^{258} \\ A_m^{259} \\ A_m^{260} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} A_s^{256} & A_{t1}^{256} & A_{t2}^{256} \\ A_s^{257} & A_{t1}^{257} & A_{t2}^{257} \\ A_s^{258} & A_{t1}^{258} & A_{t2}^{258} \\ A_s^{259} & A_{t1}^{259} & A_{t2}^{259} \\ A_s^{260} & A_{t1}^{260} & A_{t2}^{260} \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} x_s^{MeHg} \\ x_{t1}^{MeHg} \\ x_{t2}^{MeHg} \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} e^{256} \\ e^{257} \\ e^{258} \\ e^{259} \\ e^{260} \end{bmatrix} \quad (12)$$

para el pico propilado de MeHg, respectivamente.

Estas matrices permiten descomponer la distribución de isotopómeros de masa medida experimentalmente (A_m^i) en los diferentes perfiles isotópicos puros de cada componente (A_s^i , A_{t1}^i y A_{t2}^i), que se han calculado previamente,¹⁴ proporcionando las fracciones molares de cada uno de ellos.

Una vez obtenidas las fracciones molares, se puede plantear el siguiente balance molar para cada trazador:

$$N_{t1}^{IHg} + N_{t1}^{MeHg} = N_m^{IHg} x_{t1}^{IHg} + N_m^{MeHg} x_{t1}^{MeHg} \quad (13)$$

$$N_{t2}^{IHg} + N_{t2}^{MeHg} = N_m^{IHg} x_{t2}^{IHg} + N_m^{MeHg} x_{t2}^{MeHg} \quad (14)$$

Como N_{t1}^{IHg} , N_{t1}^{MeHg} , N_{t2}^{IHg} y N_{t2}^{MeHg} son conocidos, N_m^{IHg} y N_m^{MeHg} se calcularían resolviendo el anterior sistema de dos ecuaciones con dos incógnitas.

Los factores de interconversión $F1$ y $F2$ se pueden deducir de manera análoga a partir de las ecuaciones 7 y 10. Finalmente, se calcularían los moles iniciales de Hg(II) y MeHg en la muestra, N_s^{IHg} y N_s^{MeHg} , utilizando las ecuaciones 5 y 8.

Una vez desarrollada la metodología de cálculo, se realizó un estudio preliminar para comprobar que se corregían adecuadamente los procesos de metilación y desmetilación. Con este fin, se fortificó agua MilliQ y agua de mar con los compuestos de abundancia natural así como con los trazadores de mercurio inorgánico enriquecido en ^{199}Hg y metilmercurio enriquecido en ^{201}Hg , que contenía impurezas de Hg(II), y se sometieron a radiación de microondas para promover la interconversión de especies. Las recuperaciones estuvieron próximas al 100%, incluso para las condiciones más drásticas aplicadas en que se observa una importante desmetilación.

Finalmente, se aplicó el procedimiento de dilución isotópica con doble trazador propuesto a la especiación de Hg en tejidos de pescado. Para ello, se sometieron las muestras a una digestión básica y extracción con microondas focalizado, seguida de derivatización con tetrapropilborato de sodio, purificación de la fase orgánica con florisil y preconcentración con corriente de nitrógeno. El método fue validado satisfactoriamente en términos de concentraciones corregidas con el análisis de los materiales de referencia certificados (CRMs) BCR-464 (atún) y DOLT-4 (cazón) y en términos de factores de degradación por comparación de los resultados con los obtenidos para las mismas muestras por GC-ICP-MS. Los límites de detección fueron menores de 10 ng g^{-1} para ambas especies. La precisión se evaluó para las concentraciones presentes en los CRMs, que varían de 0.1 a $5 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$, dando coeficientes de variación entre 2-7%. Las concentraciones obtenidas en los dos CRMs analizados coincidieron con los valores certificados, demostrando la exactitud del método a esos niveles de concentración.

Entre las principales conclusiones que se extrajeron cabe destacar que, mientras que para la matriz de atún no se observaron reacciones de interconversión con las condiciones óptimas de extracción de $70 \text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 8 min seleccionadas en el microondas focalizado, para la matriz de cazón se produjo una desmetilación considerable utilizando esas mismas condiciones. Este comportamiento, que fue confirmado por GC-ICP-MS, muestra que no es posible recomendar unas condiciones de extracción óptimas para todos los tipos de matriz, haciendo evidente la necesidad de aplicar metodologías de trazadores múltiples para llevar a cabo la especiación de Hg(II) y MeHg en muestras biológicas.

3.4.1. Bibliografía

1. Mason, R.P.; Reinfelder, J.R.; Morel, F.M. *Uptake, Toxicity, and Trophic Transfer of Mercury in a Coastal Diatom*. Environ. Sci. Technol. **1996**, 30, 1835-1845.
2. Stoichev, T.; Amouroux, D.; Rodríguez Martín-Doimeadios, R.C.; Monperrus, M.; Donard, O.F.X.; Tsalev, D.L. *Speciation analysis of mercury in aquatic environment*. Appl. Spectrosc. Rev. **2006**, 41, 591-619.
3. Huang, J.-H. *Artifact formation of methyl- and ethyl-mercury compounds from inorganic mercury during derivatization using sodium tetra(n-propyl)borate*. Anal. Chim. Acta **2005**, 532, 113-120.
4. Rodríguez Martín-Doimeadios, R.C.; Monperrus, M.; Krupp, E.; Amouroux, D.; Donard, O.F.X. *Using speciated isotope dilution with GC-inductively coupled plasma MS to determine and unravel the artificial formation of monomethylmercury in certified reference sediments*. Anal. Chem. **2003**, 75, 3202-3211.
5. Monperrus, M.; Rodríguez-González, P.; Amouroux, D.; García Alonso, J.I.; Donard, O.F.X. *Evaluating the potential and limitations of double-spiking species-specific isotope dilution analysis for the accurate quantification of mercury species in different environmental matrices*. Anal. Bioanal. Chem. **2008**, 390, 655-666.
6. Rodríguez-González, P.; García Alonso, J.I. *Recent advances in isotope dilution analysis for elemental speciation*. J. Anal. At. Spectrom. **2010**, 25, 239-259.
7. Centineo, G.; Blanco González, E.; García Alonso, J.I.; Sanz-Medel, A. *Isotope dilution SPME GC/MS for the determination of methylmercury in tuna fish samples*. J. Mass Spectrom. **2006**, 41, 77-83.
8. Centineo, G.; Rodríguez-González, P.; Blanco González, E.; García Alonso, J.I.; Sanz-Medel, A.; Cardona, N.F.; Aranda Mares, J.L.; Nebot, S.B. *Isotope dilution GC-MS routine method for the determination of butyltin compounds in water*. Anal. Bioanal. Chem. **2006**, 384, 908-914.
9. Meija, J.; Caruso, J.A. *Deconvolution of isobaric interferences in mass spectra*. J. Am. Soc. Mass Spectrom. **2004**, 15, 654-658.

10. Meija, J.; Centineo, G.; García-Alonso, J.I.; Sanz-Medel, A.; Caruso, J.A. *Interpretation of butyltin mass spectra using isotope pattern reconstruction for the accurate measurement of isotope ratios from molecular clusters*. J. Mass Spectrom. **2005**, 40, 807-814.
11. Meija, J.; Overdane, L.; Mester, Z. *Describing chemical transformations in multiple spiking isotope dilution: fundamental aspects and definitions*. Analyst **2009**, 134, 466-471.
12. Rodríguez-González, P.; Monperrus, M.; García Alonso, J.I.; Amouroux, D.; Donard, O.F.X. *Comparison of different numerical approaches for multiple spiking species-specific isotope dilution analysis exemplified by the determination of butyltin species in sediments*. J. Anal. At. Spectrom. **2007**, 22, 1373-1382.
13. González-Gago, A.; Marchante-Gayón, J.M.; Ferrero, M.; García-Alonso, J.I. *Synthesis of ⁸¹Br-labeled polybrominated diphenyl ethers and their characterization using GC(EI)MS and GC(ICP)MS*. Anal. Chem. **2010**, 82, 2879-2887.
14. Centineo, G.; Rodríguez-González, P.; Blanco González, E.; García; Alonso, J.I.; Sanz-Medel, A. *Simultaneous determination of mono-, di- and tributyltin in environmental samples using isotope dilution gas chromatography mass spectrometry*. J. Mass Spectrom. **2004**, 39, 485-494.

3.4.2. Artículo científico 5

“Multiple spiking species-specific isotope dilution analysis by molecular mass spectrometry: simultaneous determination of inorganic mercury and methylmercury in fish tissues”

A. Castillo, P. Rodríguez-González, G. Centineo, A.F. Roig-Navarro and J.I. García Alonso.

Analytical Chemistry, 82 (2010) 2773–2783.

Anal. Chem. 2010, 82, 2773–2783

Multiple Spiking Species-Specific Isotope Dilution Analysis by Molecular Mass Spectrometry: Simultaneous Determination of Inorganic Mercury and Methylmercury in Fish Tissues

Ángel Castillo,[†] Pablo Rodríguez-González,[‡] Giuseppe Centineo,[§] Antoni Francesc Roig-Navarro,[†] and J. Ignacio García Alonso^{*,‡}

Department of Physical and Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Oviedo, Julián Clavería 8, 33006 Oviedo, Spain, Research Institute for Pesticides and Water, Universitat Jaume I, E-12071, Castello, Spain, and Innovative Solutions in Chemistry S.L., Edificio Científico-Tecnológico Campus de “El Cristo”, Oviedo, Spain

This work demonstrates, for the first time, the applicability of multiple spiking isotope dilution analysis to molecular mass spectrometry exemplified by the speciation analysis of mercury using GC(EI)MS instrumentation. A double spike isotope dilution approach using isotopically enriched mercury isotopes has been applied for the determination of inorganic mercury Hg(II) and methylmercury (MeHg) in fish reference materials. The method is based on the application of isotope pattern deconvolution for the simultaneous determination of degradation-corrected concentrations of methylmercury and inorganic mercury. Mass isotopomer distributions are employed instead of isotope ratios to calculate the corrected concentrations of the Hg species as well as the extent of species degradation reactions. The isotope pattern deconvolution equations developed here allow the calculation of the different molar fractions directly from the GC(EI)MS mass isotopomer distribution pattern and take into account possible impurities present in the spike solutions employed. The procedure has been successfully validated with the analysis of two different certified reference materials (HCR-464 and DOLT-4) and with the comparison of the results obtained by GC(ICP)MS. For the tuna fish matrix (BCR-464), no interconversion reactions were observed at the optimized conditions of open focused microwave extraction at 70 °C during 8 min. However, significant demethylation was found under the same conditions in the case of the certified dogfish liver DOLT-4. Methylation and demethylation factors were confirmed by GC(ICP)MS. Transformation reactions have been found to depend on the sample matrix and on the derivatization reagent employed. Thus, it is not possible to recommend optimum extraction conditions suitable for all types of matrices demonstrating the need to apply multiple spiking methodologies for the determination of MeHg and Hg(II) in biological samples. Double spike isotope dilution analysis methodologies using widespread GC(EI)MS instrumentation are proposed here for the routine analysis of inorganic mercury and methylmercury in fish samples. The estimated method detection limits were below 10 ng g⁻¹ for

both mercury species. Precision was evaluated for the concentrations present in the certified reference materials (CRMs) which vary from 0.1 to 5 µg g⁻¹, achieving values of coefficients of variation ranging from 7% to 2%. The concentrations obtained in both CRMs analyzed were in excellent agreement with the certified values, demonstrating the accuracy of the method at these concentration levels.

Mercury occurs in the environment in different chemical forms. Among them, methylmercury (MeHg), which is formed by methylation of inorganic mercury (Hg(II)) in aquatic environments, is the most toxic and can be biomagnified by a factor of 10⁵–10⁷ in predatory fish¹ causing adverse effects in humans and wildlife via fish consumption.² Consequently, “Hg and its compounds” have been recently included in the list of priority pollutants of the European Union (Decision 2455/2001/EC) and a maximum level of 0.5 µg Hg g⁻¹ (wet weight) has been established in different foodstuffs (Commission Regulation EC-78/2005). In the USA, the Environmental Protection Agency (EPA) has issued recently the “Guidance for implementing the January 2001 methylmercury water quality criterion” in which a maximum level of 0.3 µg methylmercury g⁻¹ of fish tissue (wet weight) is recommended for fresh water fish, estuarine fish, and shellfish tissue. Therefore, the development of reliable and fast routine methodologies for the determination of Hg(II) and MeHg in foodstuffs is required, particularly in the field of food safety. However, the analysis of such complex matrices is still considered a challenging task.³ The main problem arises from the possible occurrence of methylation and demethylation reactions during the sample preparation and separation steps, leading to erroneous determinations.^{4–7}

* To whom correspondence should be addressed. E-mail: jiga@uniovi.es.

[†] Universitat Jaume I.

[‡] University of Oviedo.

[§] Edificio Científico-Tecnológico Campus de “El Cristo”.

(1) Craig, P. J. *Organometallic Compounds in the Environment*; Longman: Harlow, 1986; pp 65–101.

(2) *Global mercury assessment*; UNEP Chemicals: Geneva, December 2002.

(3) Stoichev, T.; Amouroux, D.; Rodriguez Martin Doimeadios, R. C.; Monperius, M.; Donard, O. F. X.; Tsalev, D. L. *Appl. Spectrosc. Rev.* 2006, 41, 591–619.

ANALYTICAL CHEMISTRY

Anal. Chem., 82 (2010) 2773–2783

Received: 26 November 2009; Accepted: 15 February 2010; Published online: 1 March 2010 in American Chemical Society DOI: 10.1021/ac9027033

Multiple spiking species-specific isotope dilution analysis by molecular mass spectrometry: simultaneous determination of inorganic mercury and methylmercury in fish tissues

A. Castillo¹, P. Rodríguez-González², G. Centineo³, A.F. Roig-Navarro¹ and J.I. García Alonso²

¹Research Institute for Pesticides and Water, Universitat Jaume I, E-12071 Castelló, Spain

²Department of Physical and Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Oviedo, Julián Clavería 8, 33006 Oviedo, Spain

³Innovative Solutions in Chemistry S.L., Edificio Científico-Tecnológico Campus de "El Cristo", Oviedo, Spain

ABSTRACT

This work demonstrates, for the first time, the applicability of multiple spiking isotope dilution analysis to molecular mass spectrometry exemplified by the speciation analysis of mercury using GC(EI)MS instrumentation. A double spike isotope dilution approach using isotopically enriched mercury isotopes has been applied for the determination of inorganic mercury Hg(II) and methylmercury (MeHg) in fish reference materials. The method is based on the application of isotope pattern deconvolution for the simultaneous determination of degradation-corrected concentrations of methylmercury and inorganic mercury. Mass isotopomer distributions are employed instead of isotope ratios to calculate the corrected concentrations of the Hg species as well as the extent of species degradation reactions. The isotope pattern deconvolution equations developed here allow the calculation of the different molar fractions directly from the GC(EI)MS mass isotopomer distribution pattern and take into account possible impurities present in the spike solutions employed. The procedure has been successfully validated with the analysis of two different certified reference materials (BCR-464 and DOLT-4) and with the comparison of the results obtained by GC(ICP)MS. For the tuna fish matrix (BCR-464), no interconversion reactions were observed at the optimized conditions of open focused microwave extraction at 70 °C during 8 min. However, significant demethylation was found under the same conditions in the case of the certified dogfish liver DOLT-4. Methylation and demethylation factors were confirmed by GC(ICP)MS. Transformation reactions have been found to depend on the sample matrix and on the derivatization reagent employed. Thus, it is not possible to recommend

optimum extraction conditions suitable for all types of matrices demonstrating the need to apply multiple spiking methodologies for the determination of MeHg and Hg(II) in biological samples. Double spike isotope dilution analysis methodologies using widespread GC(EI)MS instrumentation are proposed here for the routine analysis of inorganic mercury and methylmercury in fish samples. The estimated method detection limits were below 10 ng g^{-1} for both mercury species. Precision was evaluated for the concentrations present in the certified reference materials (CRMs) which vary from 0.1 to $5 \mu\text{g g}^{-1}$, achieving values of coefficients of variation ranging from 7% to 2%. The concentrations obtained in both CRMs analyzed were in excellent agreement with the certified values, demonstrating the accuracy of the method at these concentration levels.

INTRODUCTION

Mercury occurs in the environment in different chemical forms. Among them, methylmercury (MeHg), which is formed by methylation of inorganic mercury (Hg(II)) in aquatic environments, is the most toxic and can be biomagnified by a factor of 10^5 – 10^7 in predatory fish¹ causing adverse effects in humans and wildlife via fish consumption.² Consequently, “Hg and its compounds” have been recently included in the list of priority pollutants of the European Union (Decision 2455/2001/EC) and a maximum level of $0.5 \mu\text{g Hg g}^{-1}$ (wet weight) has been established in different foodstuffs (Commission Regulation EC-78/2005). In the USA, the Environmental Protection Agency (EPA) has issued recently the “Guidance for implementing the January 2001 methylmercury water quality criterion” in which a maximum level of $0.3 \mu\text{g methylmercury g}^{-1}$ of fish tissue (wet weight) is recommended for fresh water fish, estuarine fish, and shellfish tissue. Therefore, the development of reliable and fast routine methodologies for the determination of Hg(II) and MeHg in foodstuffs is required, particularly in the field of food safety. However, the analysis of such complex matrices is still considered a challenging task.³ The main problem arises from the possible occurrence of methylation and demethylation reactions during the sample preparation and separation steps, leading to erroneous determinations.^{4–7}

The use of multiple spiking isotope dilution analysis enables the quantification of the extent of those processes, providing the accurate determination of Hg(II) and MeHg in different environmental samples.^{8–12} For this purpose, both compounds enriched in a different mercury isotope are added to the sample and are equilibrated with the endogenous compounds before the occurrence of any transformation reaction. In the last years, several methodologies based on multiple-spiking “species-specific” isotope dilution analysis have been developed for Cr, Hg, and Sn speciation and satisfactorily applied to water, sediments, and biological tissues.^{8,13–16} All the reported methods involve the combination of a chromatographic separation hyphenated to

inductively coupled plasma mass spectrometry (ICPMS) for elemental isotope ratio determinations. However, ICPMS is normally employed in routine testing laboratories only for total elemental analysis while the determination of organometallic compounds, such as tributyltin or methylmercury, is usually performed by analytical procedures based on molecular mass spectrometric techniques. Hence, the development of double spike methodologies using widespread GC(EI)MS instrumentation could be a promising alternative for the routine determination of inorganic and methylmercury. However, due to the nonelement-selective determination by GC(EI)MS, the measurement of elemental isotope ratios is more difficult than when using GC(ICP)MS. In molecular mass spectrometry, elemental isotope ratios are convoluted with the isotope ratios of the elements C, H, N, and O present as ligands of the metal. Additionally, the possible coelution of other organic compounds may produce interfering ions. Therefore, mathematical equations to correct for such isotopic contributions and the application of cleanup steps at the end of the sample preparation have been proposed in order to achieve accurate results.¹⁷⁻²¹

For the isotope dilution analysis of organic compounds, the molecules are usually prepared labeled with ^{13}C or deuterium. For mercury speciation, the labeling is normally performed in the heteroatom (Hg in this work) for three main reasons: no isotopic effects should be expected for mercury, transalkylation reactions occurring during the sample preparation steps will not affect the results, and multiple isotopes can be used for labeling. Thus, the use of ^{13}C or deuterium based tracers would not correct for all error sources occurring throughout the whole Hg speciation procedure.

A few methods based on GC(EI)MS have been reported recently for single spike isotope dilution analysis¹⁷⁻²¹ of organometallic compounds of tin and mercury. Nevertheless, those single spike methods cannot correct for species interconversion which is a common problem in the determination of inorganic mercury and methylmercury in real solid samples.

In this work, a molecular mass spectrometric technique, GC(EI)MS, has been employed for the first time for the development of a multiple spiking methodology able to accurately quantify mercury species in real solid samples regardless of the transformation reactions occurring during the chemical analysis. Through measuring mass isotopomer distributions, we demonstrate that GC(EI)MS is a suitable technique to quantify accurately the degradation factors of Hg(II) and MeHg as well as the degradation corrected concentrations in biological environmental samples. The developed equations, based on isotope pattern deconvolution (IPD), allow the calculation of the concentrations of Hg(II) and MeHg directly from the GC(EI)MS mass isotopomer distribution (isotope pattern) without the measurement or calculation of elemental isotope ratios.

This is a clear methodological difference from other patented double spike techniques in elemental speciation.^{22,23} Additionally, the equations developed take into account possible impurities of the spike solutions employed. The methodology has been successfully validated in terms of corrected concentrations by analyzing the certified reference materials (CRMs) BCR-464 (tuna fish) and DOLT-4 (dogfish liver) and in terms of degradation factors by the comparison of the results with those obtained in the same samples by GC(ICP)MS.

EXPERIMENTAL SECTION

Instrumentation

Chromatographic separations were performed with an Agilent (Agilent Technologies, Tokyo, Japan) gas chromatograph model 6890N fitted with an automatic split/ splitless injector and a HP-5MS capillary column (cross-linked 5% phenyl methyl siloxane, 30 m × 0.25 mm i.d. × 0.25 μm coating). The gas chromatograph was coupled to an Agilent (Agilent Technologies, Tokyo, Japan) mass spectrometric detector model 5973 Network MSD (quadrupole based). When the determination of the samples was carried out by GC(ICP)MS, an Agilent gas chromatograph model 6890N equipped with a HP-5MS capillary column was coupled to an Agilent 7500c inductively coupled plasma mass spectrometer (Agilent) using the laboratory-made transfer line described in detail elsewhere.²⁴ The extraction of the methylmercury species from the solid matrices was performed using a focused microwave system Discover (CEM, Mathews, NC) equipped with an autosampler Explorer (CEM).

Reagents and Materials

Stock solutions of Hg(II) and MeHg (1000 mg Hg L⁻¹) of natural isotope composition were prepared by dissolving analytical grade mercury chloride (Strem Chemicals, Newburyport, MA) in 1% HCl and methylmercury chloride (Strem Chemicals) in methanol, respectively. Working standard solutions were prepared daily by appropriate dilution of the stock solutions in 1% HNO₃ (subboiling distillation of concentrated HNO₃ from Merck, Darmstadt, Germany). Isotopically enriched certified standards, ¹⁹⁹Hg-enriched inorganic mercury and ²⁰¹Hg-enriched methylmercury, were purchased from ISC-Science (Oviedo, Spain). The mercury isotopic composition and the concentrations of both spikes was certified by GC(ICP)MS measurements and was checked by reverse isotope dilution analysis using our GC(EI)MS procedure. Particularly, the ²⁰¹Hg-enriched methylmercury standard contained traces of ²⁰¹Hg-enriched inorganic mercury. For certification, this standard was spiked in two independent experiments: first with

natural abundance methylmercury and second with natural abundance inorganic mercury for the determination of the Hg(II) impurity in the ^{201}Hg -enriched methylmercury solution. The obtained concentration of ^{199}Hg -enriched inorganic mercury was $165.0 \pm 2.0 \mu\text{g Hg g}^{-1}$, while the ^{201}Hg -enriched methylmercury presented a MeHg content of $5.49 \pm 0.3 \mu\text{g Hg g}^{-1}$ and a Hg(II) impurity of $19.5 \pm 1.5 \text{ ng Hg g}^{-1}$, which were in agreement with the certified values provided by the manufacturer.

The certified reference materials BCR-464 (tuna fish) and DOLT-4 (dogfish liver) were purchased from the IRMM (Institute for Reference Materials and Measurements, Geel, Belgium) and the NRC (National Research Council of Canada), respectively. The seawater sample employed in this work was taken from the San Lorenzo beach in Gijón (Asturias, Northwest Spain).

For the extraction of mercury species from the solid matrices, a 25% tetramethyl ammonium hydroxide (TMAH) solution from Sigma-Aldrich (Lyon, France) was employed. Sodium tetrapropyl borate (Galab, Geesthacht, Germany) and sodium tetraethyl borate (Galab) solutions of 2% (w/v) were prepared in Milli Q water. A buffer solution at pH 5.3 was prepared by mixing appropriate volumes of 0.2 M acetic acid (Merck) and 0.2 M sodium acetate (Merck) solutions. Ultrapure water was obtained from a Milli-Q system (Quantum EX, Millipore, Billerica, MA). All other chemicals and solvents were of analytical-reagent grade or better. Glassware was cleaned overnight in chromic acid and rinsed with Milli-Q water. The PTFE-coated magnetic stirring bars for the microwave extractions were used only once and were disposed after each analysis.

Procedures

Extraction and Derivatization of the Mercury Species

A sample weight of ca. 100 mg was placed inside the 10 mL microwave glass vessel and spiked with the necessary amounts of the isotopically labeled compounds according to the random error propagation theory.²⁵ Then, 4 mL of TMAH 25% were added and the slurry was introduced in the focused microwave (MW) oven. The unit provided an accurate control of both temperature and pressure inside the glass vial throughout the whole microwave assisted digestion. The optimization of the digestion conditions was performed in a range from 2 to 8 min and temperatures of 70–130 °C.

The derivatization of the Hg species was carried out in 7 mL clear glass vials with a screw cap (Supelco, Bellefonte, PA) in which a volume of 4 mL of acetic acid/sodium acetate buffer (0.1 mol L⁻¹) was previously added. After the MW assisted extraction, 1 mL of the extracted

sample was diluted in the buffer solution and adjusted to pH 4 with ultrapure hydrochloric acid or concentrated ammonium hydroxide. Then, 1 mL of hexane and 0.3 mL of 2% w/v sodium tetrapropyl borate or sodium tetraethyl borate was added and the vial was shaken manually for 5 min. After that, the sample was centrifuged (2500 rpm for 5 min), and the organic phase was cleaned-up using homemade florisil columns, as described in a previous publication.²⁶ Finally, the samples were transferred to 2 mL chromatographic vials and stored at -18 °C until analysis. Depending on the concentration of the analytes in the organic layer and the detection technique used, an additional step of preconcentration was carried out in a dedicated unit (Minivap, Supelco, Bellefonte PA) under a gentle stream of nitrogen to a few microlitres just before measurement.

Separation and Measurement of Mass Isotopomer Distributions

Helium was employed as a carrier gas with a constant flow of 1.2 mL min⁻¹. The column temperature was initially held at 50 °C for 1 min and then increased at 30 °C min⁻¹ to a final temperature of 300 °C. Injection was performed using a split/splitless injector in the pulsed splitless mode at 260 °C using 1 min of purge time and 60 psi of pulse pressure. When the GC(EI)MS system was used, the transfer line and the ion source temperatures were 280 and 230 °C, respectively, and the electron ionization was performed at an electron energy of 70 eV. A mass range from m/z 100–300 was recorded in the full-scan mode to check for spectral interferences. The measurement of mass isotopomer distributions for Hg(II) and MeHg was performed on the molecular ion using 10 ms dwell-time per mass. Five consecutive masses (corresponding to mercury isotopes 198, 199, 200, 201, and 202) were used for the selective ion monitoring (SIM) mode. When using the GC(ICP)MS coupling, the transfer line temperature was set at 280 °C, and the masses monitored were 198, 199, 200, 201, 202, and 204 using 33 ms of dwell-time per mass.

The mass isotopomer distributions were calculated by dividing the peak area obtained for each mass by the sum of all peak areas measured for each compound.

RESULTS AND DISCUSSION

Development of the Equations for Double Spike Isotope Pattern Deconvolution Using GC(EI)MS

In a double spike experiment, the sample, containing both inorganic mercury and methylmercury, is spiked with a known amount of Hg(II) enriched in a given isotope (here ¹⁹⁹Hg) and MeHg enriched in a second minor isotope of mercury (here ²⁰¹Hg). Ideally, the enriched

spike containing Hg(II) should not contain any MeHg and viceversa. However, from a practical point of view, it is very common that impurities of the second species are present in the spike solutions, and this fact has to be taken into account in the calculations. In our case, the 201-MeHg tracer used contained 201-Hg(II) impurities. As a result, the molar balances calculated for both Hg(II) and MeHg after spiking will have the form:

$$N_m^{IHg} = N_s^{IHg} + N_{t1}^{IHg} + N_{t2}^{IHg} \quad (1)$$

and

$$N_m^{MeHg} = N_s^{MeHg} + N_{t1}^{MeHg} + N_{t2}^{MeHg} \quad (2)$$

In these equations the subscript "m" stands for mixture, "s" is for sample, "t1" is for the ¹⁹⁹Hg tracer, and "t2" is for the ²⁰¹Hg tracer. Superscripts Hg(II) and MeHg stand for the compounds considered, and N is the number of moles for each form present or added. For Hg(II) the contribution of N_{t2}^{IHg} should be very small and arises from the Hg(II) impurities in the MeHg spike t2. Needless to say, the values of N_{t1}^{IHg} , N_{t1}^{MeHg} , N_{t2}^{MeHg} and N_{t2}^{IHg} are known or certified.

During sample extraction, derivatization or measurement a fraction of Hg(II) may convert into MeHg or vice versa. Also, both processes could occur in the same or different stages of sample preparation. We will assume that isotope equilibration has taken place before any interconversion reaction occurs. The transformation reaction of Hg(II) into MeHg or that of MeHg into Hg(II) modifies the molar balances as we have to take into account the fraction of Hg(II) which is lost and the fraction of MeHg which is formed and vice versa. So, if we take into account the methylation factor (F_1 , the molar fraction of inorganic mercury methylated) and the demethylation factor (F_2 , the molar fraction of methylmercury demethylated), we obtain the following:^{14,27,28}

$$N_m^{IHg} = (N_s^{IHg} + N_{t1}^{IHg} + N_{t2}^{IHg})(1 - F_1) + (N_s^{MeHg} + N_{t1}^{MeHg} + N_{t2}^{MeHg})F_2 \quad (3)$$

and

$$N_m^{MeHg} = (N_s^{MeHg} + N_{t1}^{MeHg} + N_{t2}^{MeHg})(1 - F_2) + (N_s^{IHg} + N_{t1}^{IHg} + N_{t2}^{IHg})F_1 \quad (4)$$

At the end of the procedure the inorganic mercury detected in the mixture, N_m^{IHg} , could have three distinct isotopic signatures (isotope patterns)—that of natural abundance mercury (s), that of ¹⁹⁹Hg (t1), and that of ²⁰¹Hg (t2)—and the same could be said for methylmercury, N_m^{MeHg} .

On the basis of previous works,^{14,27} molar balances can be established as a function of the different isotopic patterns of the endogenous and enriched species. The system of equations

obtained from those molar balances can be solved by multiple linear regression. Additional advantages of this approach in comparison with other existing approaches, such as the internal correction of the mass bias²⁷ and the accurate correction of opposite degradation processes,²⁸ have been detailed previously. Thus, following the mathematical description given previously,²⁷ we can establish two overdetermined systems of equations for each species expressed in matrix notation as

$$\begin{bmatrix} A_m^{256} \\ A_m^{257} \\ A_m^{258} \\ A_m^{259} \\ A_m^{260} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} A_s^{256} & A_{t1}^{256} & A_{t2}^{256} \\ A_s^{257} & A_{t1}^{257} & A_{t2}^{257} \\ A_s^{258} & A_{t1}^{258} & A_{t2}^{258} \\ A_s^{259} & A_{t1}^{259} & A_{t2}^{259} \\ A_s^{260} & A_{t1}^{260} & A_{t2}^{260} \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} x_s^{MeHg} \\ x_{t1}^{MeHg} \\ x_{t2}^{MeHg} \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} e^{256} \\ e^{257} \\ e^{258} \\ e^{259} \\ e^{260} \end{bmatrix} \quad (5)$$

for the propylated MeHg peak and

$$\begin{bmatrix} A_m^{284} \\ A_m^{285} \\ A_m^{286} \\ A_m^{287} \\ A_m^{288} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} A_s^{284} & A_{t1}^{284} & A_{t2}^{284} \\ A_s^{285} & A_{t1}^{285} & A_{t2}^{285} \\ A_s^{286} & A_{t1}^{286} & A_{t2}^{286} \\ A_s^{287} & A_{t1}^{287} & A_{t2}^{287} \\ A_s^{288} & A_{t1}^{288} & A_{t2}^{288} \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} x_s^{IHg} \\ x_{t1}^{IHg} \\ x_{t2}^{IHg} \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} e^{284} \\ e^{285} \\ e^{286} \\ e^{287} \\ e^{288} \end{bmatrix} \quad (6)$$

for the propylated Hg(II) peak, respectively.

In eqs 5 and 6, the experimentally measured mass isotopomer distributions in the mixture for the different masses *i*, A_m^i , are deconvoluted to get the molar fractions from the three isotope patterns considered: the natural pattern (s), the Hg(II) pattern (t1), and the MeHg pattern (t2). Obviously, the theoretical patterns, A_s^i , A_{t1}^i , and A_{t2}^i , for the pure components must be known. The procedure is better explained in Figure 1. The experimentally measured isotope patterns for the peaks of methylmercury and inorganic mercury are deconvoluted mathematically using the theoretically calculated isotope patterns for the pure components. The results of the calculations are the molar fractions x_s , x_{t1} , and x_{t2} for each compound.

When using GC(EI)MS, the isotopic pattern of the molecular or fragment ions measured are different from the elemental pattern expected, owing to the contributions from the organic groups attached to Hg containing ¹³C and ²H. Mathematical equations to correct for such contributions using the known isotopic abundance of those isotopes have been used previously.²⁹ In this work, the theoretical patterns of natural and isotopically enriched mercury species were calculated for the molecular ion selected for measurement.

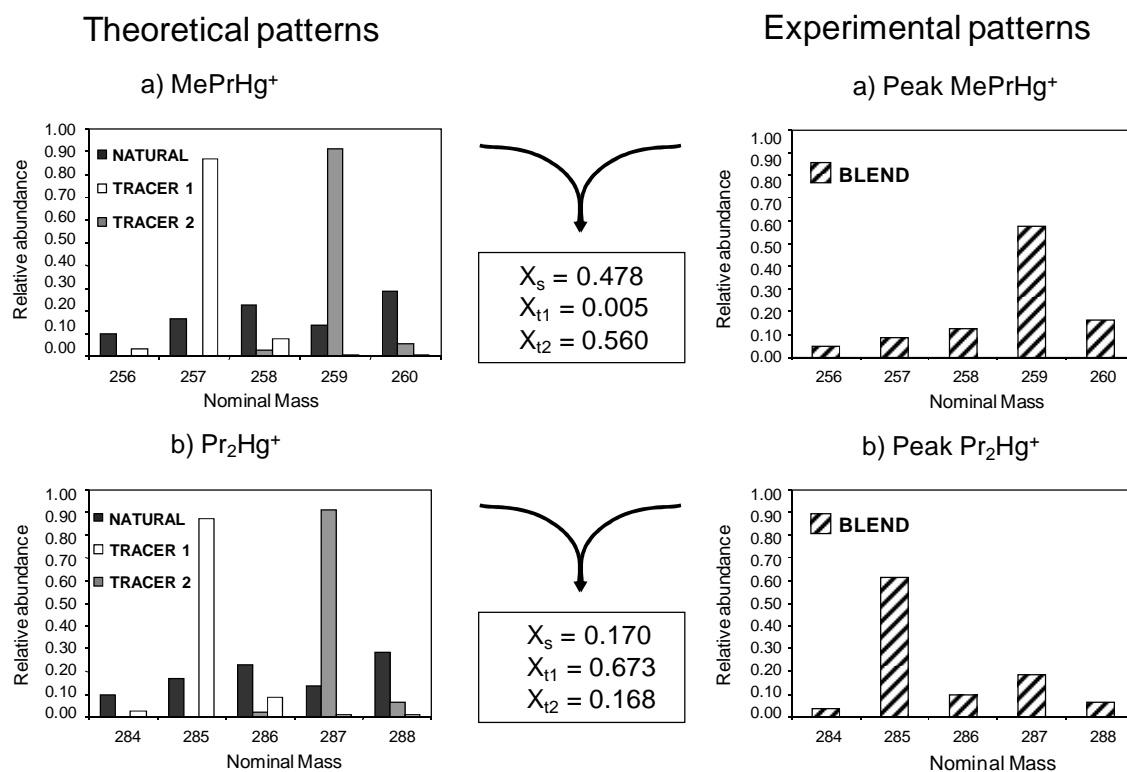


Figure 1. Deconvolution of the experimental isotope patterns for the peaks of methylmercury and inorganic mercury in the theoretical patterns of the sample “s”, the ¹⁹⁹Hg tracer “t1” and the ²⁰¹Hg tracer “t2”. The contribution of each theoretical pattern corresponds to x_s , x_{t1} and x_{t2} for each compound.

The molar fractions calculated using eqs 5 and 6 correspond to the following partial mass balances in eqs 3 and 4, respectively,

$$x_s^{IHg} = \frac{N_s^{IHg} (1 - F_1) + N_s^{MeHg} (F_2)}{N_m^{IHg}} \quad (7)$$

$$x_{t1}^{IHg} = \frac{N_{t1}^{IHg} (1 - F_1) + N_{t1}^{MeHg} (F_2)}{N_m^{IHg}} \quad (8)$$

$$x_{t2}^{IHg} = \frac{N_{t2}^{IHg} (1 - F_1) + N_{t2}^{MeHg} (F_2)}{N_m^{IHg}} \quad (9)$$

from eq 3 and

$$x_s^{MeHg} = \frac{N_s^{MeHg} (1 - F_2) + N_s^{IHg} (F_1)}{N_m^{MeHg}} \quad (10)$$

$$x_{t1}^{MeHg} = \frac{N_{t1}^{MeHg} (1 - F_2) + N_{t1}^{IHg} (F_1)}{N_m^{MeHg}} \quad (11)$$

$$x_{t2}^{MeHg} = \frac{N_{t2}^{MeHg} (1 - F_2) + N_{t2}^{IHg} (F_1)}{N_m^{MeHg}} \quad (12)$$

from eq 4.

The interconversion factors F_1 and F_2 can be obtained by dividing eqs 8 and 9 for Hg(II) and eqs 11 and 12 for MeHg. We obtain two equations with two unknowns which could be solved for F_1 and F_2 :

$$F_1 \left(x_{t2}^{IHg} N_{t1}^{IHg} - x_{t1}^{IHg} N_{t2}^{IHg} \right) + F_2 \left(x_{t1}^{IHg} N_{t2}^{MeHg} - x_{t2}^{IHg} N_{t1}^{MeHg} \right) = \left(x_{t2}^{IHg} N_{t1}^{IHg} - x_{t1}^{IHg} N_{t2}^{IHg} \right) \quad (13)$$

and

$$F_1 \left(x_{t2}^{MeHg} N_{t1}^{IHg} - x_{t1}^{MeHg} N_{t2}^{IHg} \right) + F_2 \left(x_{t1}^{MeHg} N_{t2}^{MeHg} - x_{t2}^{MeHg} N_{t1}^{MeHg} \right) = \left(x_{t1}^{MeHg} N_{t2}^{MeHg} - x_{t2}^{MeHg} N_{t1}^{MeHg} \right) \quad (14)$$

The general eqs 13 and 14 reduce to the most common equations used in the literature^{27,28} when the enriched spikes used are pure (i.e., $N_{t2}^{IHg} = 0$ and $N_{t1}^{MeHg} = 0$).

It is worth mentioning here that equations used in the literature for the determination of the degradation factors and corrected concentrations²⁷ can be also obtained by rationing eqs 8 and 11 for tracer 1 and eqs 9 and 12 for tracer 2.

Once the observed molar degradation factors F_1 and F_2 are calculated, the original concentrations of Hg(II) and MeHg in the sample, N_s^{IHg} and N_s^{MeHg} , can be calculated from the ratios of eqs 7 and 8 for Hg(II) and eqs 10 and 12 for MeHg. The final equations are now:

$$N_s^{IHg} x_{t1}^{IHg} (1 - F_1) + N_s^{MeHg} x_{t1}^{IHg} (F_2) = x_s^{IHg} \left[N_{t1}^{IHg} (1 - F_1) + N_{t1}^{MeHg} (F_2) \right] \quad (15)$$

and

$$N_s^{IHg} x_{t2}^{MeHg} (F_1) + N_s^{MeHg} x_{t2}^{MeHg} (1 - F_2) = x_s^{MeHg} \left[N_{t2}^{MeHg} (1 - F_2) + N_{t2}^{IHg} (F_1) \right] \quad (16)$$

So, the original number of moles in the sample for Hg(II) and MeHg, N_s^{IHg} and N_s^{MeHg} , can be calculated by solving this set of two equations with two unknowns.

Determination of the Mass Isotopomer Distribution of the Pure Components

In order to apply correctly eqs 5 and 6, the theoretical mass isotopomer distributions for the different pure components must be calculated. The contribution of the isotope composition of mercury (7 isotopes), carbon (2 isotopes), and hydrogen (2 isotopes) to the mass isotopomer distribution of the molecule needs to be calculated.

This can be done by applying the binomial distribution to the different combinations of isotopes of carbon, hydrogen, and mercury in the molecular ions considered. However, as it was reported previously,³⁰ the molecular and in-source fragment ions generated in the electron impact source can differ in one or several hydrogen atoms, being the ion cluster measured a mixture of different ions. Therefore, a complete cluster characterization must be performed before isotope dilution analysis in order to quantify the contribution of each individual source to the overall selected cluster. First, the ethylated and propylated natural mercury compounds were injected to the GC-MS in SCAN mode acquisition (m/z 100-300) to identify the corresponding peaks and fragmentation pathway as well as to select the acquisition windows for subsequent GC-MS in the SIM mode. The dwell time was also studied to avoid spectral skew or bad counting statistics, obtaining an optimum value of 10 ms for the mercury isotopes monitored. Then, standard solutions of natural abundance Hg(II), natural abundance methylmercury, ^{201}Hg -enriched methylmercury, and ^{199}Hg -enriched Hg(II) were derivatized with NaBEt_4 or NaBPr_4 and analyzed by electron impact GC-MS. The resulting cluster ions, namely, the molecular ion (MeHgEt^+ and HgEt_2^+ or MeHgPr^+ and HgPr_2^+), the loss of methyl group of the molecule (HgEt^+ or HgPr^+), and the loss of the derivatizing ethyl or propyl group (MeHg^+ and HgEt^+ or HgPr^+) were monitored in SIM mode. To evaluate the spectral purity of each cluster ion, multiple linear regression between measured cluster abundances and theoretical abundances of the ion with the expected number of hydrogen atoms (M), one extra hydrogen ($M + H$), and one or two hydrogen less ($M - H$, $M - 2H$) were established. For example, in the case of MeHgEt^+ , the measured cluster was compared with the theoretical clusters of $\text{C}_3\text{H}_8\text{Hg}$, $\text{C}_3\text{H}_9\text{Hg}$, $\text{C}_3\text{H}_7\text{Hg}$, and $\text{C}_3\text{H}_6\text{Hg}$. The results obtained are summarized in Table 1 where we can observe that, for both derivatization agents, the larger the alkyl group lost, the less pure the ion cluster. Thereby, the molecular ion was found to provide in all cases a relative abundance of M higher than 97% and only the $M - H$ ion was detected. Concerning the in-source fragment ions, significant contributions of $M - H$, $M - 2H$, and $M + H$ were observed, and the extent depended on the derivatization agent employed and the alkyl group lost. According to these results, the theoretical isotopic patterns of the natural abundance and enriched mercury compounds must be recalculated to include, at least, the $M - H$ contribution (ca. 1%). It is worth noting that no significant differences were

observed between natural and isotopically enriched mercury compounds and between both derivatizing agents. We have observed also that the obtained fragmentation factors are reproducible at different tuning conditions of the ion source and at different concentration levels of the analyte.

Table 1. Spectral Purity of Different Fragment Ions Generated in the Electron Impact Source using NaBEt₄ (a) and NaBPr₄ (b) as Derivatization Agents^a

derivatized compound	fragment ion	relative abundances (%)			
		M	M+H	M-H	M-2H
ethylated ^{nat} MeHg	MeHgEt ⁺ (molecular)	97.7 (0.3)	-0.4 (0.3)	2.5 (0.4)	0.3 (0.3)
	HgEt ⁺ (-methyl)	85.0 (1.4)	-0.6 (1.3)	7.8 (1.4)	7.3 (1.4)
	MeHg ⁺ (-ethyl)	78.6 (0.8)	3.5 (0.7)	13.0 (0.8)	4.6 (0.7)
ethylated ²⁰¹ MeHg	MeHgEt ⁺ (molecular)	97.67 (0.13)	-0.17 (0.12)	2.09 (0.04)	0.36 (0.02)
	HgEt ⁺ (-methyl)	85.1 (1.3)	-0.1 (1.2)	7.0 (1.2)	4.0 (1.2)
	MeHg ⁺ (-ethyl)	78.5 (0.6)	4.2 (0.6)	11.7 (0.6)	4.0 (0.6)
ethylated ^{nat} Hg(II)	HgEt ₂ ⁺ (molecular)	98.6 (0.3)	-0.2 (0.3)	1.2 (0.4)	0.23 (0.25)
	HgEt ⁺ (-ethyl)	77.1 (0.7)	10.5 (0.6)	8.3 (0.8)	3.6 (0.7)
ethylated ¹⁹⁹ Hg(II)	HgEt ₂ ⁺ (molecular)	99.42 (0.14)	-0.25 (0.13)	1.12 (0.11)	0.10 (0.10)
	HgEt ⁺ (-ethyl)	79.0 (0.3)	10.8 (0.3)	7.92 (0.24)	2.00 (0.24)
	MeHgPr ⁺ (molecular)	98.4 (0.4)	-0.1 (0.3)	1.2 (0.4)	0.5 (0.4)
propylated ^{nat} MeHg	HgPr ⁺ (-methyl)	94.6 (0.8)	-0.1 (0.5)	4.3 (2.0)	1.2 (0.7)
	MeHg ⁺ (-propyl)	83.3 (0.9)	0.5 (0.8)	13.1 (0.9)	3.5 (0.8)
propylated ²⁰¹ MeHg	MeHgPr ⁺ (molecular)	98.44 (0.19)	-0.04 (0.13)	1.44 (0.09)	0.14 (0.04)
	HgPr ⁺ (-methyl)	95.2 (0.5)	0.04 (0.20)	4.0 (0.4)	0.77 (0.11)
	MeHg ⁺ (-propyl)	82.96 (0.44)	1.0 (0.4)	12.2 (0.4)	3.0 (0.4)
propylated ^{nat} Hg(II)	HgPr ₂ ⁺ (molecular)	98.8 (0.4)	-0.1 (0.3)	1.2 (0.4)	0.2 (0.4)
	HgPr ⁺ (-propyl)	68.5 (2.0)	7.8 (1.5)	22.5 (1.6)	2.1 (1.4)
propylated ¹⁹⁹ Hg(II)	HgPr ₂ ⁺ (molecular)	99.7 (0.3)	-0.30 (0.22)	0.89 (0.14)	0.08 (0.12)
	HgPr ⁺ (-propyl)	68.3 (0.4)	9.0 (0.4)	21.6 (0.5)	1.65 (0.25)

^a The relative abundances show the contribution to each cluster of the fragment ion with the expected number of hydrogens (M) and the impurities with different number of hydrogen (M + H, M – H, M - 2H). The standard uncertainty of the results corresponds to six GC-MS injections.

Evaluation of the Methodology Using Fortified Water Samples

In a preliminary study, the proposed methodology was evaluated using fortified Milli-Q water and seawater to check that adequate correction of methylation and demethylation was attained. For this purpose, the waters were spiked with around $125 \mu\text{g Hg L}^{-1}$ of both natural abundance species. Then, appropriate amounts of ^{199}Hg (as Hg(II)) and ^{201}Hg (as MeHg) were added and the samples were exposed to microwave irradiation using a focused microwave system to promote the methylation and demethylation processes. The resulting molar fractions were obtained applying the isotope pattern deconvolution approach to the MeHgEt^+ cluster of MeHg peak and HgEt_2^+ cluster of Hg(II) peak. After that, the concentrations of Hg(II) and MeHg were calculated in two different ways, using the developed double spike equations which correct for methylation and demethylation, and without considering the interconversion processes. The recoveries obtained in the samples are shown in Figure 2. As expected, no significant transformations were noticed when both fortified waters were not placed into the focused microwave oven (no irradiation). The same behavior was observed at 70°C 2 min, 70°C 4 min, and 100°C 4 min as well, leading to similar corrected and noncorrected recoveries. In the case of the stronger condition tested (130°C 4 min), significant methylation and demethylation factors were found. Under these conditions and for seawater, the methylation factor was 3.9% and the demethylation factor 9.9%. As can be observed in Figure 2, corrected recoveries were within acceptable limits (98–102%) whereas an overestimation of MeHg (Figure 2a) and Hg(II) (Figure 2b) were found when no correction for interconversion was performed (105.8% and 107.6% recovery, respectively). It is worth mentioning that the losses of the natural abundance compounds throughout the analytical process are always compensated for regardless of the equations used. For this reason, the demethylation and methylation reactions did not cause an underestimation of MeHg and Hg(II) , respectively, when using the single isotope dilution equations. However, the formation of MeHg and Hg(II) in the spiked seawater exposed to the stronger condition tested was only corrected when the developed double spiking isotope dilution equations were applied.

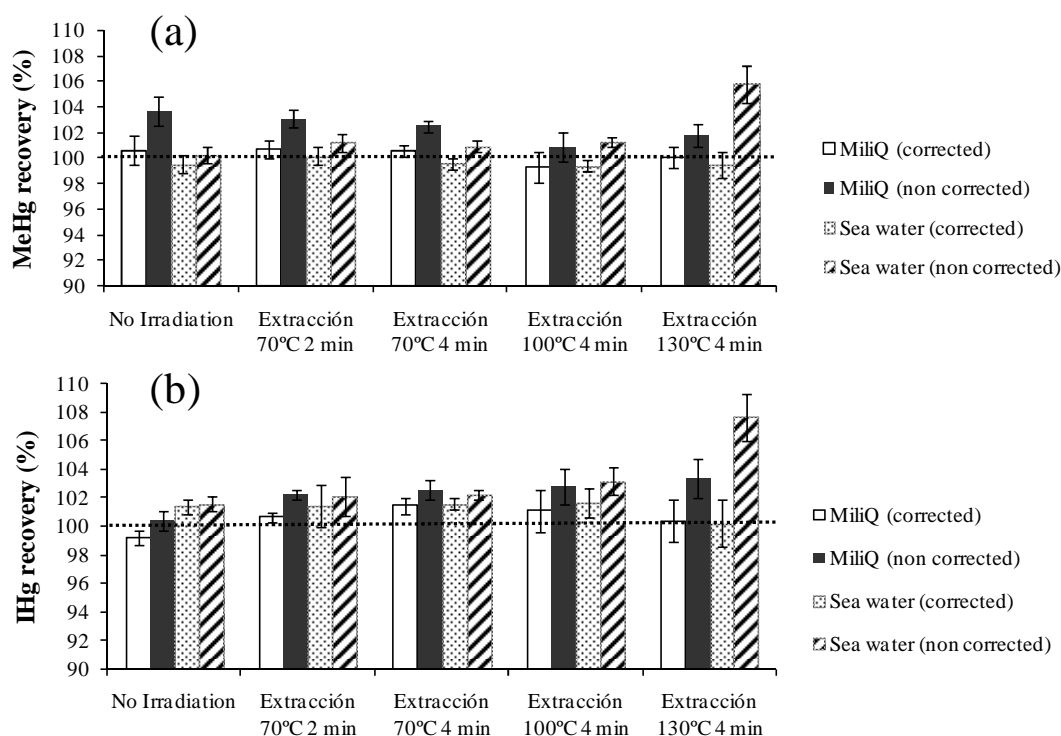


Figure 2. Comparison between corrected and non corrected recovery using different extraction conditions in fortified Milli-Q water and sea water for (a) MeHg and (b) Hg(II). The extent of methylation and demethylation processes was quantified through the GC(EI)MS IPD equations to correct the concentration of each species (around 125 $\mu\text{g Hg L}^{-1}$).

Extraction of Mercury Species from Biological Samples

The capability of the proposed methodology to extract the Hg species from biotissues and correct for their transformation reactions was first evaluated with the analysis of the CRM BCR-464 (tuna fish). To this end, 0.1 g of the fish tissue was spiked with ^{201}Hg -enriched methylmercury and ^{199}Hg -enriched Hg(II) before addition of TMAH 25%. Then, different digestion experiments were performed at a temperature of 70 °C and irradiation times from 1 to 8 min in the focused microwave. This range of conditions was selected according to a previous work.³¹ In addition, one of the vials was not exposed to microwaves (0 min irradiation time) but requiring 1 h for complete TMAH digestion. The concentrations obtained in all the experiments were in agreement with the certified values for all the conditions tested. The methylation (F_1) and demethylation (F_2) factors obtained are shown in Figure 3. An unexpected high demethylation factor for the lower irradiation times was observed (see Figure 3a). These results were also confirmed using GC(ICP)MS. To investigate if such transformation processes took place during the

digestion or derivatization step, a similar set of experiments were conducted but adding the spikes after digestion. Figure 3a shows that similar demethylation factors were obtained in both cases. These observations confirm that the interconversion did not arise from sample digestion, but most probably during the derivatization process. To prove this statement, the aforementioned experiments were repeated using propylation instead of ethylation. The resulting interconversion factors are represented in Figure 3b. As can be seen, negligible demethylation (lower than 2%) was observed for all the irradiation times tested, except for 0 min (8% demethylation factor). Therefore, it seems that under our sample preparation conditions, MeHg is partially converted into Hg(II) during the ethylation step. A similar observation was previously described by Demuth and Heumann in the determination of MeHg in different environmental aquatic samples.⁴ In that case, the presence of iodide in the sample induced MeHg transformation into Hg(II) and Hg⁰ when ethylation was used but not with propylation. In the analysis of sediment samples Rodríguez Martín-Doimeadios³ found significant Hg(II) methylation reactions during the speciation procedure both when using NaBEt₄ and NaBPr₄ concluding that transalkylation reactions occur during the derivatization step, the mercury amount being the determining factor.

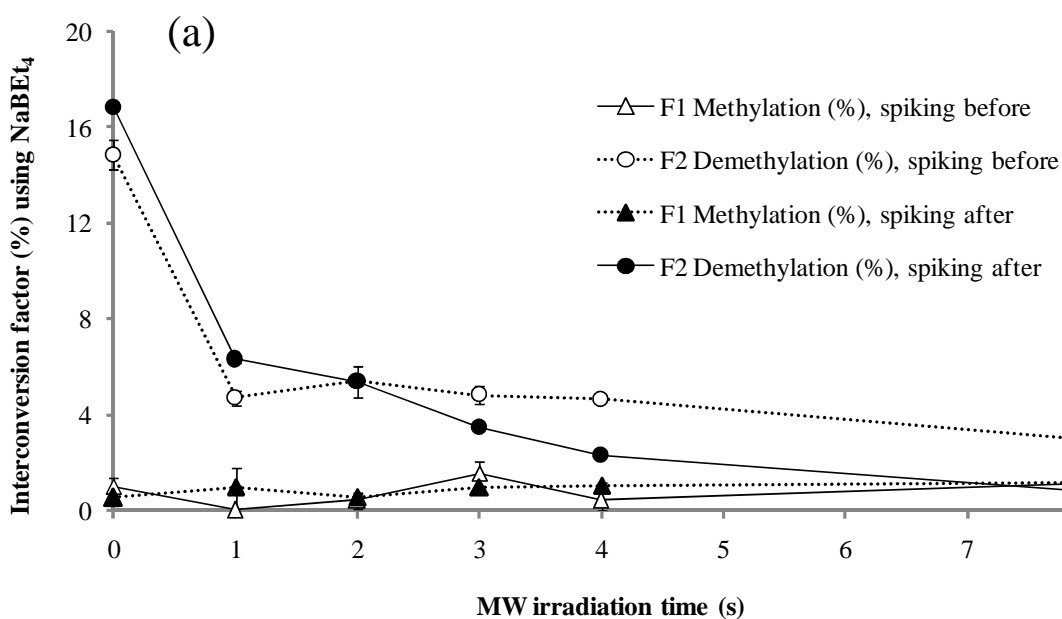


Figure 3. Effect of microwave irradiation time on methylation factors (F_1) and demethylation factors (F_2) in BCR-464 tuna fish tissue. Spikes added before and after digestion using NaBEt₄ (a) and NaBPr₄ (b) as derivatization agent. Uncertainty is expressed as 1 s standard deviation ($n = 3$ replicates).

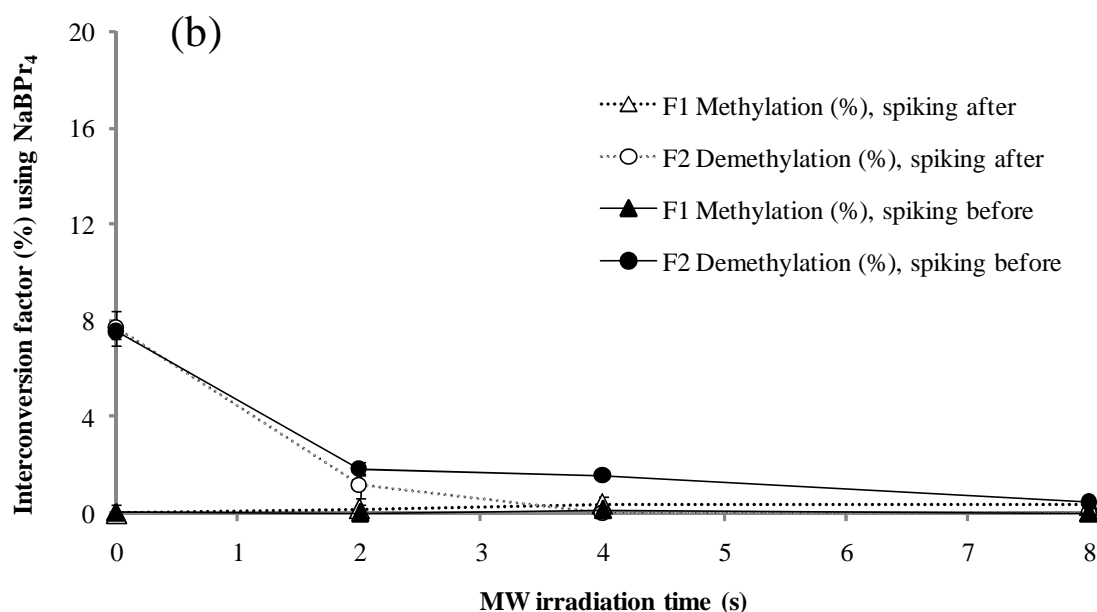


Figure 3. (continuation)

On the other hand, the occurrence of a significant MeHg demethylation in the absence of MW, even using propylation, is less clear. Since the demethylation factor decreased with the increase of MW irradiation time, we think that a total TMAH digestion of the fish tissue is required to avoid demethylation reactions during the subsequent derivatization step with NaBPr₄.

In order to study the optimum conditions for the extraction of mercury species from the CRM BCR-464, the focused microwave unit was used under different extraction conditions (70 °C, 4 min; 70 °C, 8 min; 130 °C, 4 min) and after the double spike addition before digestion. As it was previously done, a nonirradiated sample was also analyzed. The results obtained are presented in Table 2. No significant methylation was detected for any condition tested, whereas a considerable demethylation factor was found again in the nonirradiated sample (1 h at room temperature). Hence, it seems evident that the matrix promotes the transformation of MeHg into Hg(II), as it was observed before. Furthermore, a small demethylation factor (ca. 3%) at 130 °C, 4 min was observed. Table 2 also shows the calculated Hg(II) and MeHg concentrations using the developed double spike IPD equations. Satisfactory results were obtained for MeHg concentration, which were in good agreement with the certified value ($5.12 \pm 0.16 \mu\text{g g}^{-1}$). For Hg(II), no certified value is available but the sum of Hg(II) and MeHg concentrations also matches the certified value for total mercury, HgT ($5.24 \pm 0.10 \mu\text{g g}^{-1}$). Optimum extraction of 70 °C 8 min was finally established for the CRM BCR-464 (tuna fish).

Table 2. Concentrations of MeHg, Hg(II), and HgT ($\mu\text{g Hg g}^{-1}$), Methylation Factors F_1 (%Hg(II) to MeHg), and Demethylation Factors F_2 (%MeHg to Hg(II)) Obtained for Reference Material: Tuna Fish BCR-464^a

conditions	MeHg/ $\mu\text{g g}^{-1}$	Hg(II)/ $\mu\text{g g}^{-1}$	HgT/ $\mu\text{g g}^{-1}$	F_1 (%Hg(II) to MeHg)	F_2 (%MeHg to Hg(II))
no irradiation (1 h room temperature)	5.19 ± 0.06	0.130 ± 0.030	5.32 ± 0.04	0.0 ± 0.7	7.5 ± 0.3
70 °C, 4 min	5.18 ± 0.07	0.162 ± 0.021	5.34 ± 0.05	0.1 ± 0.3	1.58 ± 0.14
70 °C, 8 min	5.15 ± 0.03	0.145 ± 0.013	5.29 ± 0.03	-0.6 ± 0.4	0.46 ± 0.06
130 °C, 4 min	5.23 ± 0.02	0.132 ± 0.021	5.36 ± 0.03	0.4 ± 0.6	3.29 ± 0.12
<i>certified values</i>	<i>5.12 ± 0.16</i>		<i>5.24 ± 0.10</i>		

^a Spikes are added before digestion using NaBPr₄ as the derivatization agent. The uncertainty in the values corresponds to 1 s standard deviation of three independent GC-MS injections.

The proposed methodology was also applied to the analysis of a certified dogfish liver (CRM DOLT-4). In contrast to the CRM BCR-464, this biological tissue contains similar MeHg and Hg(II) concentrations. Sample digestion was studied using the conditions selected previously (70 °C, 4 min; 70 °C, 8 min; 130 °C, 4 min; and no irradiation), adding NaBPr₄ as the derivatization agent. In this case, both GC(EI)MS and GC(ICP)MS measurements were performed for comparison purposes. The results are presented in Table 3. As can be seen, the calculated demethylation factors differ greatly from the CRM BCR-464. The dogfish liver sample yields significant demethylation factors for all the conditions tested, ranging from 7.45% to 11.3%. The softer the extraction applied, the higher the demethylation observed. GC(EI)MS degradation factors were in good agreement with those obtained by GC(ICP)MS, as is shown in Table 3. Once again, methylation was negligible, which is in disagreement with the data reported by Reyes et al.,⁹ who observed significant methylation factors both in tuna fish and dogfish samples. Regarding MeHg, the concentrations obtained agree with the certified value ($1.33 \pm 0.12 \mu\text{g g}^{-1}$). For Hg(II), no certified value was available for this reference material either, but the sum of the calculated Hg(II) and MeHg concentration matches the certified value provided for HgT under all conditions tested regardless of the degradation factors obtained.

Table 3. Concentrations of MeHg, Hg(II), and HgT ($\mu\text{g Hg g}^{-1}$), Methylation Factors F_1 (%Hg(II) to MeHg), and Demethylation Factors F_2 (%MeHg to Hg(II)) Obtained for Reference Material: Dogfish Liver DOLT-4^a

conditions	measurement	MeHg/ $\mu\text{g g}^{-1}$	Hg(II)/ $\mu\text{g g}^{-1}$	HgT/ $\mu\text{g g}^{-1}$	F_1 (%Hg(II) to MeHg)	F_2 (%MeHg to Hg(II))
no irradiation (1 h room temperature)	GC(EI)MS	1.30 \pm 0.03	1.14 \pm 0.04	2.44 \pm 0.05	0.28 \pm 0.09	11.3 \pm 0.8
	GC(ICP)MS	1.31	1.14	2.45	-0.26	10.2
70 °C, 4 min	GC(EI)MS	1.360 \pm 0.005	1.287 \pm 0.019	2.647 \pm 0.014	0.26 \pm 0.06	10.7 \pm 0.9
	GC(ICP)MS	1.35	1.33	2.68	-0.2	10.9
70 °C, 8 min	GC(EI)MS	1.352 \pm 0.006	1.318 \pm 0.008	2.670 \pm 0.013	0.08 \pm 0.09	9.05 \pm 0.33
	GC(ICP)MS	1.30	1.31	2.61	0.4	8.6
130 °C, 4 min	GC(EI)MS	1.316 \pm 0.020	1.352 \pm 0.010	2.67 \pm 0.03	0.29 \pm 0.21	7.45 \pm 0.05
	GC(ICP)MS	1.34	1.28	2.63	0.2	7.4
certified values		1.33 \pm 0.12		2.58 \pm 0.22		

^a Spikes are added before digestion and derivatized with NaBPr₄. The uncertainty in the values corresponds to 1 s standard deviation of three independent GC-MS injections. Only one injection was performed for GC(ICP)MS.

Method Validation

Once the study of sample digestion was carried out, the proposed methodology was validated by analyzing two certified reference materials, BCR-464 and DOLT-4. To this end, appropriate amounts of ^{201}Hg -enriched methylmercury and ^{199}Hg -enriched inorganic mercury were added to a 0.1 g sample. It is worth stressing that the homogeneity of the material is not affected owing to the narrow geometry of the microwave disposal glass vial.³¹ The species were extracted from the biological material in the focused microwave unit at 70 °C, 8 min and derivatized with NaBPr_4 . Finally, a cleanup with florisil was carried out to allow a higher preconcentration factor of the samples. Three independent spiking experiments were performed and each of them was injected three times in the GC-MS. Figures 4 and 5 each show a chromatogram corresponding to the injection of BCR-464 (tuna fish) and DOLT-4 (dogfish liver), respectively. Additionally, Figures 4 and 5 show the measured mass isotopomer distributions for each compound. These observed mass isotopomer distributions can be compared to those shown in Figure 1 for the pure compounds. As illustrated, MeHg and Hg(II) peaks were readily resolved without coelution of any interfering compounds which could shift the measured abundances. It is worth noting that the peak eluted between MeHg and Hg(II) was not observed using GC(ICP)MS (data not shown), which confirms that it is an organic impurity which does not contain mercury. Also the injection of the samples using the pulsed splitless mode at 60 psi decreased significantly the peak width, particularly for MeHg, obtaining detection limits for MeHg and Hg(II) of 8.8 and 9.2 ng g⁻¹, respectively (calculated as three times the standard deviation of $n = 9$ independent blank values). The results obtained are listed in Table 4. As can be seen, the concentrations obtained were in very good agreement with the certified values with an excellent reproducibility, validating the proposed procedure. Once again, the extracts were reanalyzed using GC(ICP)MS, leading to the same transformation factors, which confirms the suitability of the GC(EI)MS system to carry out accurate double-spiking species-specific isotope dilution analysis.

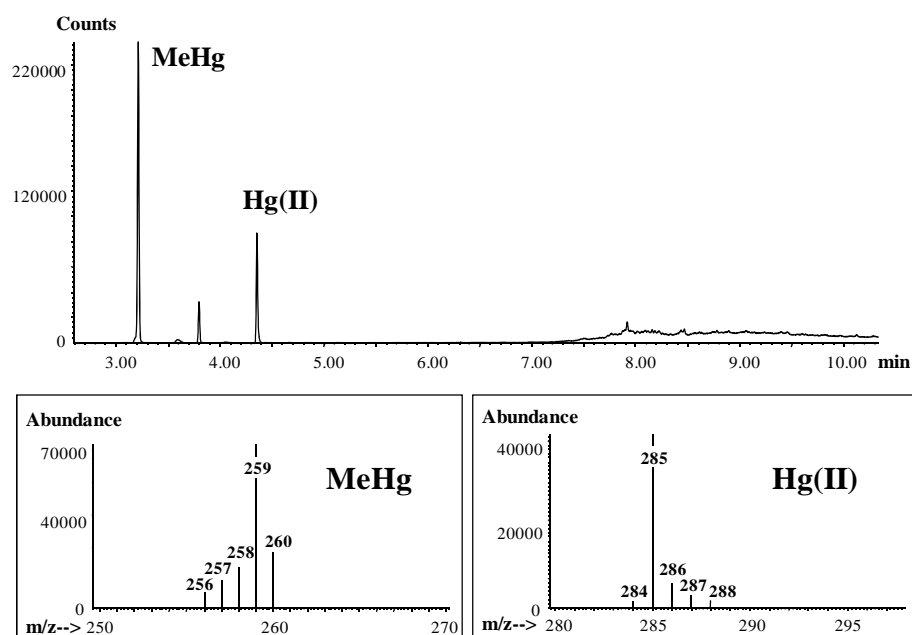


Figure 4. GC(EI)MS chromatogram for Hg speciation after double-spiking of ^{199}Hg (Hg(II)) and ^{201}Hg (MeHg) and propylation derivatization in tuna fish tissue (BCR-464). The measured isotope abundances for each peak are also indicated.

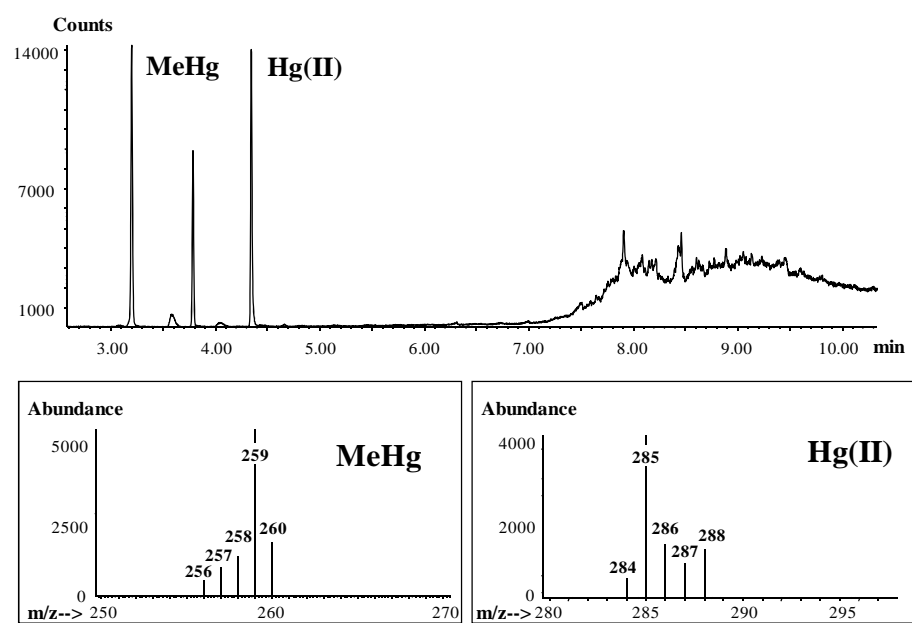


Figure 5. GC(EI)MS chromatogram for Hg speciation after double-spiking of ^{199}Hg (Hg(II)) and ^{201}Hg (MeHg) and propylation in dogfish liver (DOLT-4). The measured isotope abundances for each peak are also indicated.

Table 4. Concentrations of MeHg, Hg(II) and HgT ($\mu\text{g Hg g}^{-1}$) Obtained in the Analysis of Different Certified Reference Materials Digested at the Optimum Conditions (70 °C 8 min)^a

material	measurement	MeHg/ $\mu\text{g g}^{-1}$	Hg(II)/ $\mu\text{g g}^{-1}$	HgT/ $\mu\text{g g}^{-1}$	F_1 (%Hg(II) to MeHg)	F_2 (%MeHg to Hg(II))
BCR-464 (tuna fish)	GC(EI)MS	5.10 ± 0.08	0.098 ± 0.007	5.20 ± 0.08	0.44 ± 0.21	1.56 ± 0.18
	GC(ICP)MS	5.16 ± 0.08	0.070 ± 0.012	5.23 ± 0.07	0.24 ± 0.13	1.23 ± 0.20
	<i>certified values</i>	5.12 ± 0.16		5.24 ± 0.10		
DOLT-4 (dogfish liver)	GC(EI)MS	1.33 ± 0.03	1.32 ± 0.03	2.65 ± 0.05	0.20 ± 0.16	8.6 ± 1.0
	GC(ICP)MS	1.289 ± 0.021	1.320 ± 0.008	2.609 ± 0.013	0.12 ± 0.23	8.33 ± 0.51
	<i>certified values</i>	1.33 ± 0.12		2.58 ± 0.22		

^a The uncertainty in the values corresponds to 1 s standard deviation of three independent spiking experiments.

CONCLUSIONS

The present work opens for the first time, the applicability of multiple spiking IDA to molecular mass spectrometry. We have exemplified this application with the mercury speciation analysis using the less-expensive and widespread GC(EI)MS instrumentation and commercially available enriched ^{199}Hg (Hg(II)) and ^{201}Hg (MeHg) spikes. The use of GC(EI)MS for mercury speciation could be a good alternative to the more sophisticated and less available GC(ICP)MS coupling. The application of isotope pattern deconvolution has allowed the calculation of the concentrations of Hg(II) and MeHg directly from the GC(EI)MS mass isotopomer distributions of the Hg species without the measurement or calculation of elemental isotope ratios. The proposed double spike IPD equations take also into account possible impurities in the enriched spikes used and enable the accurate correction for species interconversion, providing concentrations in agreement with the certified values of the CRMs analyzed. However, the accuracy of the proposed procedure should be tested at lower concentration levels in real samples. The methodology developed in this work comprises clear methodological differences from other patented double spike techniques in elemental speciation^{22,23} as it only requires the measurement of mass isotopomer distributions of the analyte species instead of elemental isotope ratios in the species-specific chromatographic transient signals.

Finally, it has been demonstrated that the transformation reactions not only depend on the sample digestion procedure and/or conditions but also on the matrix to be analyzed. According to this, the use of classical calibration approaches or even the use of single isotope spikes in Hg speciation analysis will not provide reliable results unless a previous study of the matrix-specific extraction conditions for each sample is performed. However, the use of a multiple-spiking methodology ensures the reliable routine application of one set of optimized extraction conditions to all sample types regardless of species interconversion reactions.

ACKNOWLEDGEMENT

Fundació Caixa Castelló -Bancaixa is acknowledged for the financial support provided to Á.C. P.R.-G. would like to acknowledge the Spanish Ministry of Science and Innovation for his research contract under the Juan de la Cierva Program. The Spanish Ministry of Science and Innovation is acknowledged for funding through project CTQ2006-05722. This work was partially carried out in the frame of the IDEA project ref ANR-08-CES-13 of the Agence Nationale de la Recherche (France). Finally, Enrico Rubino and Vertex Technics S.L. are acknowledged for the loan of the Explorer focused microwave unit employed in this work.

REFERENCES

- (1) Craig, P. J. *Organometallic Compounds in the Environment*; Longman: Harlow, 1986; pp 65–101.
- (2) *Global mercury assessment*; UNEP Chemicals: Geneva, December 2002.
- (3) Stoichev, T.; Amouroux, D.; Rodríguez Martín-Doimeadios, R. C.; Monperrus, M.; Donard, O. F. X.; Tsalev, D. L. *Appl. Spectrosc. Rev.* **2006**, *41*, 591–619.
- (4) Demuth, N.; Heumann, K. G. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 4020–4027.
- (5) Hammerschmidt, C. R.; Fitzgerald, W. F. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 5930–5936.
- (6) Rodríguez Martín-Doimeadios, R. C.; Monperrus, M.; Krupp, E.; Amouroux, D.; Donard, O. F. X. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 3202–3211.
- (7) Falter, R.; Hintelmann, H.; Quevauviller, P. *Chemosphere* **1999**, *39*, 1039–1049.
- (8) Hintelmann, H.; Evans, R. D.; Fresenius' J. *Anal. Chem.* **1997**, *358*, 378–385.
- (9) Reyes, L. H.; Rahman, G. M. M.; Kingston, H. M. J. *Anal. Chim. Acta* **2009**, *631*, 121–128.
- (10) Monperrus, M.; Rodríguez-González, P.; Amouroux, D.; García Alonso, J. I.; Donard, O. F. X. *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *390*, 655–666.
- (11) Monperrus, M.; Krupp, E.; Amouroux, D.; Donard, O. F. X.; Rodríguez Martín-Doimeadios, R. C. *Trends Anal. Chem.* **2004**, *23*, 261–272.
- (12) Rahman, G. M. M.; Kingston, H. M. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 3548–3555.
- (13) Kingston, H. M.; Huo, D.; Lu, Y.; Chalk, S. *Spectrochim. Acta Part B: Atom. Spectrosc.* **1998**, *53*, 299–309.
- (14) Meija, J.; Yang, L.; Caruso, J. A.; Mester, Z. J. *Anal. At. Spectrom.* **2006**, *21*, 1294–1297.
- (15) Rodríguez-González, P.; García Alonso, J. I.; Sanz-Medel, A. J. *Anal. At. Spectrom.* **2004**, *19*, 767–772.
- (16) Rodríguez-González, P.; García Alonso, J. I.; Sanz-Medel, A. J. *Anal. At. Spectrom.* **2005**, *20*, 1076–1084.
- (17) Centineo, G.; Blanco González, E.; García Alonso, J. I.; Sanz-Medel, A. J. *Mass Spectrom.* **2006**, *41*, 77–83.
- (18) Yang, L.; Colombini, V.; Maxwell, P.; Mester, Z.; Sturgeon, R. E. J. *Chromatogr. A* **2003**, *1011*, 135–142.

- (19) Moreno, M. J.; Pacheco-Arjona, J.; Rodríguez-González, P.; Preud'Homme, H.; Amouroux, D.; Donard, O. F. X. *J. Mass Spectrom.* **2006**, *41*, 1491–1497.
- (20) Centineo, G.; Blanco González, E.; Sanz-Medel, A. J. *Chromatogr. A* **2004**, *1034*, 191–197.
- (21) Centineo, G.; Rodríguez-González, P.; Blanco González, E.; García Alonso, J. I.; Sanz-Medel, A.; Cardona, N. F.; Aranda Mares, J. L.; Nebot, S. B. *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, *384*, 908–914.
- (22) Kingston, H. M. *Method of Speciated Isotope Dilution Mass Spectrometry*. United States Patent 5,414,259, May 1995.
- (23) Kingston, H. M. *Speciated Isotope Dilution Mass Spectrometry or reactive species and related methods*. United States Patent 6,790,673, September 2004.
- (24) Montes-Bayón, M.; Gutiérrez Camblor, M.; García; Alonso, J. I.; Sanz-Medel, A. J. *Anal. Atom. Spectrom.* **1999**, *14*, 1317–1322.
- (25) García Alonso, J. I. A. *Anal. Chim. Acta* **1995**, *312*, 57–78.
- (26) Ceulemans, M.; Witte, C.; Lobinski, R.; Adams, F. C. *Appl. Organomet. Chem.* **1994**, *8*, 451–461.
- (27) Rodríguez-González, P.; Monperrus, M.; García Alonso, J. I.; Amouroux, D.; Donard, O. F. X. *J. Anal. At. Spectrom.* **2007**, *22*, 1373–1382.
- (28) Meija, J.; Ouerdane, L.; Mester, Z. *Analyst* **2009**, *134*, 466–471.
- (29) Centineo, G.; Rodríguez-González, P.; Blanco González, E.; García; Alonso, J. I.; Sanz-Medel, A. J. *Mass Spectrom.* **2004**, *39*, 485–494.
- (30) Meija, J.; Caruso, J. A. J. *Am. Soc. Mass Spectrom.* **2004**, *15*, 654–658.
- (31) Pacheco-Arjona, J.; Rodríguez-González, P.; Valiente, M.; Barclay, D.; Donard, O. F. X. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **2008**, *88*, 923–932.

CAPÍTULO 4

Aplicación de la deconvolución de perfiles isotópicos a la espectrometría de masas en tándem de baja resolución

CAPÍTULO 4. APLICACIÓN DE LA DECONVOLUCIÓN DE PERFILES ISOTÓPICOS A LA ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TÁNDEM DE BAJA RESOLUCIÓN

4.1. Introducción.....	211
4.2. Determinación y confirmación de diclofenaco en aguas sin curva de calibrado mediante IPD y LC-MS/MS con analizador QqQ.....	219
4.2.1. Bibliografía.....	225
4.2.2. Artículo científico 6.....	227
“Isotope pattern deconvolution-tandem mass spectrometry for calibration-free quantification in organic analysis. Application to the determination and confirmation of diclofenac in wastewaters”	
Anal. Chim. Acta (submitted)	

4.1. INTRODUCCIÓN

Existe una enorme cantidad de compuestos químicos prioritarios que pueden encontrarse en nuestro entorno y cuyo contenido máximo está legislado por motivos diversos como el control de procesos, del estado del medioambiente o de la salud humana. Para cada uno de ellos se necesita de metodología analítica fiable que proporcione su concentración con adecuada precisión, exactitud y trazabilidad en distintos tipos de matrices tanto industriales, medioambientales como biológicas. La puesta a punto y uso de esta metodología analítica es parte fundamental del trabajo diario de cualquier Laboratorio de Ensayo. Las muestras que deben analizarse y, por tanto, las matrices con las que deben enfrentarse estos laboratorios, pueden ser tan simples como un agua subterránea o tan complejas como un sedimento o un fluido biológico.

Hoy en día, la inmensa mayoría de ensayos analíticos se llevan a cabo mediante el acoplamiento de una técnica de separación (LC o GC, en función de la polaridad y volatilidad del analito concreto) a la técnica de detección Espectrometría de Masas (MS). La matriz que, inevitablemente, acompaña a los analitos de interés (incluso después de complejos procesos de tratamiento de muestra) puede provocar problemas severos en la etapa de medida instrumental, el conocido efecto matriz, que puede conllevar graves errores de cuantificación. En GC-MS (Q) la coelución de otros compuestos junto con el analito puede causar interferencias en el espectro de masas, que pueden ser solventadas mejorando la separación cromatográfica, aplicando una etapa de purificación eficaz y/o aumentando la selectividad con espectrometría de masas en tándem (MS/MS).¹ En el caso de LC-MS/MS (QqQ), el efecto matriz se traduce en una modificación de la ionización, especialmente con

interfases de electrospray (ESI). Para minimizar esta depresión o exaltación de la señal del analito se han propuesto diferentes estrategias: cuantificación mediante calibrado en matriz, utilización de interfases diferentes, dilución de la muestra, mejora de la purificación y separación cromatográfica, así como el uso de patrones internos análogos estructuralmente.¹⁻⁵ Sin embargo, debido a la gran complejidad y diversidad en la composición y concentración de la matriz de las muestras, la aplicación de estos procedimientos, en muchas ocasiones, no resuelve el problema adecuadamente.⁶⁻¹²

Por este motivo, en los últimos años se está extendiendo el uso de patrones internos marcados con un isótopo estable (SIL-IS), pues son estructuralmente idénticos al analito de interés y presentan prácticamente el mismo comportamiento físico-químico. Como consecuencia de ello, el SIL-IS coeluye con el analito y se ve sometido al mismo efecto matriz.¹³ Esta técnica, conocida como espectrometría de masas con dilución isotópica (IDMS) se basa en la medida de la relación de áreas de pico del analito y SIL-IS en el espectrómetro de masas. La concentración de analito en la muestra se calcula representando una curva de calibrado con disoluciones patrón del compuesto natural de concentración creciente fortificadas con la misma cantidad de patrón interno que la muestra. Para no tener problemas de solapamiento en el espectro de masas el SIL-IS presenta un exceso de masa igual o superior a tres unidades. Naturalmente, el ion seleccionado debe mantener ese incremento de masa, por lo que hay que evitar las fragmentaciones que impliquen una pérdida del marcaje. Sin embargo, la disolución de marcado suele contener pequeñas cantidades de compuesto natural que interfieren en la señal de los patrones de analito, que a su vez pueden contribuir ligeramente en la intensidad del SIL-IS. Esto provoca una desviación de la linealidad de la curva de calibrado para las relaciones molares del compuesto natural y del marcado bajas y altas, haciendo que sea lineal sólo en una región restringida.¹⁴ Los SIL-IS suelen estar marcados con ^{13}C , ^{15}N o ^2H . En este último caso, dado que el ^2H tiene el doble de masa que el ^1H , los enlaces $\text{C}-^2\text{H}$ y $\text{C}-^1\text{H}$ presentan diferente polarizabilidad, lo que puede ocasionar que los tiempos de retención del compuesto natural y del marcado sean distintos.¹⁵⁻¹⁸ Así, para minimizar estas diferencias y corregir correctamente el efecto matriz se suele reducir el número de átomos marcados a los estrictamente necesarios.¹⁴

Cabe comentar una segunda ventaja de la cuantificación mediante IDMS respecto a las otras estrategias de calibración (tales como calibración externa o adiciones estándar). Una vez equilibrada la muestra con el analito marcado, las posibles pérdidas de sustancia durante el tratamiento de muestra afectarán por igual al analito natural y al compuesto marcado, de manera que la medida de la relación isotópica no se verá alterada. En consecuencia, no es necesario conocer los factores de preconcentración o dilución de la muestra ni tener en cuenta las etapas de separación o evaporación no cuantitativas. Todo ello confiere a IDMS una gran exactitud y precisión, siendo la técnica más adecuada para desarrollar métodos de referencia.^{19,20} Aunque en la actualidad existen pocos patrones marcados isotópicamente y además son muy caros, cosa que limita su aplicación, la previsión es que su número vaya en aumento y que disminuyan los precios.¹⁹

Una alternativa a la IDMS convencional es la herramienta de cálculo de Deconvolución de Perfiles Isotópicos (IPD). En este caso, y teniendo en cuenta que la relación isotópica no depende de la sensibilidad instrumental, no se hace uso de curvas de calibrado, lo que permite el cálculo de la concentración de analito a partir de una única inyección. El cálculo de la deconvolución se lleva a cabo mediante regresión lineal multivariante e implica la medida de todo o parte del perfil isotópico (distribución de isotopómeros de masa) en la mezcla de compuesto natural y marcado. Se asume que la composición isotópica de la mezcla es una combinación lineal de dos perfiles isotópicos: el del compuesto natural y el análogo marcado, resultantes de la contribución de los diferentes isótopos de cada elemento constituyente en la molécula. El cálculo mediante regresión lineal multivariante proporciona la fracción molar de ambos compuestos en la mezcla y, dado que la relación de fracciones molares es igual a la relación de concentraciones en la muestra, la concentración de analito. Además, este procedimiento permite la superposición espectral de los *clusters* natural y marcado y la corrección de interferencias en el espectro de masas, dado que permite incluir en los cálculos más isótopos que los estrictamente requeridos para el análisis por dilución isotópica.²¹

El cálculo mediante IPD aparece pues como una alternativa prometedora a la determinación de compuestos orgánicos mediante IDMS convencional.

Recientemente, se ha aplicado IDMS en combinación con IPD a GC-MS (Q) haciendo uso de compuestos marcados con Hg enriquecido, bromo y ^{13}C .²²⁻²⁴ No obstante, la aplicación de IPD a compuestos orgánicos utilizando espectrometría de masas en tándem es mucho más compleja y no ha sido descrita aún. En este capítulo se detalla cómo la fragmentación de la molécula de analito modifica su perfil isotópico y se propone un procedimiento de cálculo para tener en cuenta dicha variación y hacer posible su cuantificación mediante IPD. Como prueba de concepto se ha escogido la determinación de diclofenaco en muestras de agua residual mediante UHPLC(ESI)MS/MS utilizando diclofenaco- d_4 como compuesto marcado. Debido a la presencia de dos cloros en la molécula y a que la eficiencia de marcaje isotópico con 4 átomos de deuterio es inferior al 100%, se produce una superposición en los *clusters* que interfiere las transiciones utilizadas en la cuantificación y confirmación. Para corregir adecuadamente dichas contribuciones, se ha calculado la distribución de iones productos de cada perfil isotópico resultantes de la pérdida neutra de masa seleccionada y se han comparado con los valores experimentales obtenidos para varias matrices y niveles de concentración. Por otro lado, se ha descartado la existencia de posibles efectos isotópicos del compuesto deuterado durante la etapa de extracción e ionización. Para ello, se representó la relación de fracciones molares, obtenidas experimentalmente utilizando IPD, de distintas mezclas de analito natural y marcado en función del cociente de sus concentraciones. Si ambos compuestos presentan el mismo comportamiento originarán una recta con pendiente 1 y ordenada en el origen 0. Además, se ha restado la contribución del marcado en la transición de confirmación, lo que ha dado lugar a *Q/q ratios* exclusivos del compuesto natural, lo que no sería posible utilizando la relación de áreas de pico. Finalmente, se ha reducido el número de transiciones incluidas en el procedimiento propuesto a un total de tres, con el fin de no comprometer la multiresidualidad del método. La metodología se ha validado para agua superficial, agua residual y agua residual depurada. Los resultados obtenidos se muestran en el **artículo científico 6**.

Bibliografía

1. Hao, C.; Zhao, X.; Yang, P. *GC-MS and HPLC-MS analysis of bioactive pharmaceuticals and personal-care products in environmental matrices*. Trends Anal. Chem. **2007**, 26, 569-580.
2. Trufelli, H.; Palma, P.; Famiglini, G.; Cappiello, A. *An overview of matrix effects in liquid chromatography*. Mass Spectrom. Rev. **2011**, 30, 491-509.
3. Chiu, M.L.; Lawi, W.; Snyder, S.T.; Wong, P.K.; Liao, J.C.; Gau, V. *Matrix effects—A challenge toward automation of molecular analysis*. J. Assoc. Lab. Automat. **2010**, 15, 233-242.
4. Van Eeckhaut, A.; Lanckmans, K.; Sarre, S.; Smolders, I.; Michotte, Y. *Validation of bioanalytical LC-MS/MS assays: Evaluation of matrix effects*. J. Chromatogr. B **2009**, 877, 2198-2207.
5. Matuszewski, B.K.; Constanzer, M.L.; Chavez-Eng, C.M. *Strategies for the Assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS*. Anal. Chem. **2003**, 75, 3019-3030.
6. Hewavitharana, A.K. *Matrix matching in liquid chromatography-mass spectrometry with stable isotope labelled internal standards—Is it necessary?* J. Chromatogr. A **2011**, 1218, 359-361.
7. Kasprzyk-Hordern, B.; Dinsdale, R.M.; Guwy, A.J. *The effect of signal suppression and mobile phase composition on the simultaneous analysis of multiple classes of acidic/neutral pharmaceuticals and personal care products in surface water by solid-phase extraction and ultra performance liquid chromatography-negative electrospray tandem mass spectrometry*. Talanta **2008**, 74, 1299-1312.
8. Marín, J.M.; Sancho, J.V.; Pozo, O.J.; López, F.J.; Hernández, F. *Quantification and confirmation of anionic, cationic and neutral pesticides and transformation products in water by on-line solid phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. J. Chromatogr. A **2006**, 1133, 204-214.

9. Hernández, F.; Sancho, J.V.; Pozo, O.J. *Critical review of the application of liquid chromatography/mass spectrometry to the determination of pesticide residues in biological samples*. Anal. Bioanal. Chem. **2005**, 382, 934-946.
10. Sancho, J.V.; Pozo, O.J.; López, F.J.; Hernández, F. *Different quantification approaches for xenobiotics in human urine samples by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry*. Rapid Commun. Mass Spectrom. **2002**, 16, 639-645.
11. Wieling, J. *LC-MS-MS experiences with internal standards*. Chromatographia, **2002**, Suppl. 55, S107-S113.
12. Lagerwerf, F.M.; Van Dongen, W.D.; Steenvoorden, R.J.J.M.; Horning, M.; Jonkman, J.H.G. *Exploring the boundaries of bioanalytical quantitative LC-MS-MS*, Anal. Chem. **2000**, 19, 418-427.
13. Sojo, L.E.; Lum, G.; Chee, P. *Internal standard signal suppression by co-eluting analyte in isotope dilution LC-ESI-MS*. Analyst **2003**, 128, 51-54.
14. Rychlik, M.; Asam, S. *Stable isotope dilution assays in mycotoxin analysis*, Anal. Bioanal. Chem. **2008**, 390, 617-628.
15. Kim, Y.; Ahn, S.; Chang, T. *Isotopic effect in the separation of polystyrene by normal phase and reversed phase liquid chromatography*. Anal. Chem. **2010**, 82, 1509-1514.
16. Lindergardh, N.; Annerberg, A.; White, N.J.; Day, N.P.J. *Development and validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometric method for determination of piperazine in plasma. Stable isotope labeled internal standard does not always compensate for matrix effects*. J. Chromatogr. B **2008**, 862, 227-236.
17. Wang, S.; Cyronak, M.; Yang, E. *Does a stable isotopically labeled internal standard always correct analyte response? A matrix effect study on a LC/MS/MS method for the determination of carvedilol enantiomers in human plasma*. J. Pharm. Biomed. Anal. **2007**, 43, 701-707.

18. Turowski, M.; Yamakawa, N.; Meller, J.; Kimata, K.; Ikegami, T. Hosoya, K.; Tanaka, N.; Thornton, E.R. *Deuterium isotope effects on hydrophobic interactions: the importance of dispersion interactions in the hydrophobic phase*. J. Am. Chem. Soc. **2003**, 125, 13836-13849.
19. Mechlinska, A.; Wolska, L.; Namiesnik, J. *Isotope-labeled substances in analysis of persistent organic pollutants in environmental samples*. Trends Anal. Chem. **2010**, 29, 820-831.
20. Boden, A.R.; Reiner, E.J. Development of an isotope-dilution gas chromatographic-mass spectrometric method for the analysis of polycyclic aromatic compounds in environmental matrices. Polycyclic Aromat. Compd. **2004**, 24,309-323.
21. Rodríguez-González, P.; García Alonso, J.I. *Recent advances in isotope dilution analysis for elemental speciation*. J. Anal. At. Spectrom. **2010**, 25, 239-259.
22. Castillo, A.; Rodríguez-González, P.; Centineo, G.; Roig-Navarro, A.F.; García Alonso, J.I. *Multiple spiking species-specific isotope dilution analysis by molecular mass spectrometry: simultaneous determination of inorganic mercury and methylmercury in fish tissues*. Anal. Chem. **2010**, 82, 2773-2783.
23. González-Gago, A.; Marchante-Gayón, J.M.; Ferrero, M.; García Alonso, J.I. *Synthesis of ^{81}Br -labeled polybrominated diphenyl ethers and their characterization using GC(EI)MS and GC(ICP)MS*. Anal. Chem. **2010**, 82, 2879-2887.
24. González-Antuña, A.; Rodríguez-González, P.; Centineo, G.; García Alonso, J.I. *Evaluation of minimal ^{13}C -labelling for stable isotope dilution in organic analysis*. Analyst **2010**, 135, 953-964.

4.2. DETERMINACIÓN Y CONFIRMACIÓN DE DICLOFENACO EN AGUAS SIN CURVA DE CALIBRADO MEDIANTE IPD Y LC-MS/MS CON ANALIZADOR QqQ

El diclofenaco sódico, o acetato de (o-((2,6-diclorofenil)amino)fenil de sodio es uno de los antiinflamatorios más utilizados a nivel mundial. Su mecanismo de acción consiste en la inhibición de la síntesis de prostaglandinas en los tejidos inflamados, lo cual le confiere propiedades analgésicas, antipiréticas y antiinflamatorias. En cuanto a sus efectos secundarios cabe destacar su toxicidad gastrointestinal, que puede originar lesiones en la mucosa digestiva, desde simples irritaciones hasta la producción de úlceras pépticas o perforaciones intestinales.¹ Como resultado de su amplio consumo, el diclofenaco está considerado como uno de los compuestos farmacéuticos activos más importantes presentes en el ciclo del agua, hallándose en aguas residuales depuradas urbanas en concentraciones que van desde varios ng L⁻¹ a unos pocos µg L⁻¹.² Estos niveles pueden por sí solos provocar efectos adversos en el medioambiente,^{3,4} pero combinados con la presencia de otros fármacos su impacto se incrementa notablemente.⁵ Por este motivo, resulta necesario desarrollar una metodología rápida, sensible y robusta que permita controlar la presencia de este conjunto de compuestos en las aguas medioambientales y residuales.

Gran parte de los métodos reportados en la bibliografía para determinar diclofenaco en aguas están basados en el uso de HPLC-ESI-MS/MS con analizador QqQ en modo SRM. A pesar de la elevada sensibilidad que proporciona este acoplamiento, a menudo se requiere una etapa de preconcentración previa por extracción en fase sólida (SPE).^{2,6} Esto conlleva que se preconcentren también algunos componentes de la matriz de la muestra, especialmente en aguas residuales, que pueden coeluir con el analito y ocasionar depresión de la señal.⁷ Para corregir este efecto matriz se suele añadir a la muestra el patrón marcado isotópicamente diclofenaco-d₄, que se utiliza como patrón interno.⁸⁻¹² Sin embargo, el *cluster* espectral de este compuesto se solapa con el de abundancia natural, lo que puede comprometer la correcta cuantificación y confirmación del analito.⁸ En efecto, la respuesta instrumental de las transiciones interferidas depende tanto del compuesto

con abundancia natural como del análogo marcado, dando lugar a curvas de calibrado no lineales y Q/q ratios diferentes de las teóricas. El procedimiento matemático IPD permite calcular la contribución de cada uno de los perfiles isotópicos, por lo que su aplicación a espectrometría de masas en tándem haría posible la utilización de las transiciones interferidas. Además, si el analito natural y marcado no presentan efectos isotópicos, se podría emplear este último como un trazador para calcular la concentración de diclofenaco directamente desde la inyección de la muestra, esto es, sin curva de calibrado.

En este trabajo se han desarrollado las ecuaciones necesarias para la aplicación de IPD a espectrometría de masas en tándem (QqQ). Para demostrar la validez de dicho procedimiento se ha escogido la determinación de diclofenaco en aguas, utilizando diclofenaco- d_4 como compuesto marcado. Basándonos en el desarrollo matemático descrito en el capítulo 1, se puede establecer el siguiente sistema de ecuaciones para los iones moleculares desprotonados del compuesto natural y del marcado que se generan durante la ionización ESI negativa:

$$\begin{bmatrix} A_{mix}^{294} \\ A_{mix}^{295} \\ A_{mix}^{296} \\ A_{mix}^{297} \\ A_{mix}^{298} \\ A_{mix}^{299} \\ A_{mix}^{300} \\ A_{mix}^{301} \\ A_{mix}^{302} \\ A_{mix}^{303} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} A_{nat}^{294} & A_{lab}^{294} \\ A_{nat}^{295} & A_{lab}^{295} \\ A_{nat}^{296} & A_{lab}^{296} \\ A_{nat}^{297} & A_{lab}^{297} \\ A_{nat}^{298} & A_{lab}^{298} \\ A_{nat}^{299} & A_{lab}^{299} \\ A_{nat}^{300} & A_{lab}^{300} \\ A_{nat}^{301} & A_{lab}^{301} \\ A_{nat}^{302} & A_{lab}^{302} \\ A_{nat}^{303} & A_{lab}^{303} \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} x_{nat} \\ x_{lab} \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} e^{294} \\ e^{295} \\ e^{296} \\ e^{297} \\ e^{298} \\ e^{299} \\ e^{300} \\ e^{301} \\ e^{302} \\ e^{303} \end{bmatrix} \quad (1)$$

donde A_{mix}^i son las abundancias relativas experimentales del compuesto en la mezcla para las diferentes masas i ; A_{nat}^i y A_{lab}^i son las abundancias relativas teóricas del diclofenaco natural y marcado isotópicamente, respectivamente; x_{nat} y x_{lab} indican las fracciones molares de cada perfil isotópico en la muestra fortificada y ' e ' es el vector error de la regresión lineal múltiple.

Es importante señalar que, en ausencia de efectos isotópicos, la proporción relativa de los *clusters* [M-H]⁻ provenientes del diclofenaco con abundancia natural y el diclofenaco-d₄ será la misma que la proporción en que se encontraba cada perfil isotópico en la muestra fortificada. De manera que conociendo los moles de diclofenaco marcado añadidos, N_{lab} , se pueden calcular los moles de diclofenaco con abundancia natural en la muestra, N_{nat} , mediante la ecuación (2), sin requerir calibración metodológica.

$$N_{nat} = N_{lab} \frac{x_{nat}}{x_{lab}} \quad (2)$$

Al aplicar una energía de colisión suficiente se produce la fragmentación de los iones moleculares desprotonados anteriores. Si se selecciona la pérdida neutra de CO₂ (44 Da) se puede plantear el siguiente sistema de ecuaciones para los iones producto resultantes:

$$\begin{bmatrix} A_{mix}^{294>250} \\ A_{mix}^{295>251} \\ A_{mix}^{296>252} \\ A_{mix}^{297>253} \\ A_{mix}^{298>254} \\ A_{mix}^{299>255} \\ A_{mix}^{300>256} \\ A_{mix}^{301>257} \\ A_{mix}^{302>258} \\ A_{mix}^{303>259} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} A_{nat}^{294>250} & A_{lab}^{294>250} \\ A_{nat}^{295>251} & A_{lab}^{295>251} \\ A_{nat}^{296>252} & A_{lab}^{296>252} \\ A_{nat}^{297>253} & A_{lab}^{297>253} \\ A_{nat}^{298>254} & A_{lab}^{298>254} \\ A_{nat}^{299>255} & A_{lab}^{299>255} \\ A_{nat}^{300>256} & A_{lab}^{300>256} \\ A_{nat}^{301>257} & A_{lab}^{301>257} \\ A_{nat}^{302>258} & A_{lab}^{302>258} \\ A_{nat}^{303>259} & A_{lab}^{303>259} \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} x_{nat} \\ x_{lab} \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} e^{294>250} \\ e^{295>251} \\ e^{296>252} \\ e^{297>253} \\ e^{298>254} \\ e^{299>255} \\ e^{300>256} \\ e^{301>257} \\ e^{302>258} \\ e^{303>259} \end{bmatrix} \quad (3)$$

Los valores $A_{mix}^{i>j}$ corresponden a las abundancias relativas medidas del compuesto en la mezcla para la transición SRM de masas nominales $i > j$; $A_{nat}^{i>j}$ y $A_{lab}^{i>j}$ son las abundancias relativas teóricas para la transición $i > j$ de cada perfil isotópico y x_{nat} y x_{lab} las fracciones molares de diclofenaco natural y marcado en la muestra fortificada.

Hay que reseñar que las composiciones isotópicas que contienen ¹³C, ¹⁷O y/o ¹⁸O originan pérdidas neutras mayores de 44 Da, generando más iones producto que

los incluidos en la ecuación (3). En esos casos, la abundancia teórica del ion producto seleccionado será menor que la del ion precursor de partida. Los diferentes valores $A_{nat}^{i>j}$ y $A_{lab}^{i>j}$ se calcularon teóricamente teniendo en cuenta la abundancia relativa de las diferentes composiciones isotópicas y el número de isótopos implicados en la pérdida neutra, dando lugar a la siguiente expresión matricial:

$$\begin{bmatrix} A_{mix}^{294>250} \\ A_{mix}^{295>251} \\ A_{mix}^{296>252} \\ A_{mix}^{297>253} \\ A_{mix}^{298>254} \\ A_{mix}^{299>255} \\ A_{mix}^{300>256} \\ A_{mix}^{301>257} \\ A_{mix}^{302>258} \\ A_{mix}^{303>259} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 0.48896 & 0.00001 \\ 0.07110 & 0.00068 \\ 0.31769 & 0.01321 \\ 0.04570 & 0.11493 \\ 0.05313 & 0.38770 \\ 0.00741 & 0.12703 \\ 0.00050 & 0.24762 \\ 0.00002 & 0.04622 \\ 0.00000 & 0.04111 \\ 0.00000 & 0.00559 \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} x_{nat} \\ x_{lab} \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} e^{294>250} \\ e^{295>251} \\ e^{296>252} \\ e^{297>253} \\ e^{298>254} \\ e^{299>255} \\ e^{300>256} \\ e^{301>257} \\ e^{302>258} \\ e^{303>259} \end{bmatrix} \quad (4)$$

Una vez desarrollada la metodología de cálculo, se evaluó su aplicabilidad en la determinación de diclofenaco en muestras de agua medioambiental y residual. En primer lugar, se comprobó la validez de las abundancias teóricas calculadas. Para ello, se realizó la inyección individual del analito natural y marcado en distintas matrices y a varios niveles de concentración. Al no apreciar diferencias significativas entre los valores experimentales y teóricos se descartó la presencia de interferencias espectrales en las matrices de muestra consideradas.

Posteriormente, se examinó la posible aparición de efectos isotópicos entre el diclofenaco de abundancia natural y el marcado isotópicamente. Concretamente, se inyectaron mezclas con diferentes proporciones de diclofenaco natural y diclofenaco- d_4 y se calcularon las fracciones molares de los dos perfiles isotópicos en cada una de las disoluciones utilizando el procedimiento propuesto. De acuerdo con la ecuación (2), la representación de x_{nat} / x_{lab} frente a N_{nat} / N_{lab} debería dar una línea recta de pendiente 1 y ordenada en el origen 0. Los resultados no mostraron una desviación significativa respecto a la línea teórica anterior, lo que indica que no hay efectos isotópicos destacables. Es importante aclarar que para calcular las fracciones molares

no es necesario utilizar todas las ecuaciones del sistema matricial (4), por lo que se minimizó el número de transiciones adquiridas para no comprometer la capacidad de determinación simultánea de otros compuestos en la misma inyección cromatográfica. Las transiciones SRM seleccionadas fueron: 294 > 250, 296 > 252 y 298 > 254.

Por otro lado, se evaluó la capacidad de la metodología propuesta para fines confirmatorios. De acuerdo con el criterio *EU Decision 2002/657/EC*, la muestra se considera positiva cuando la relación de iones experimental entre la transición de cuantificación (Q) y confirmación (q) está dentro del margen de tolerancia establecido para las condiciones de análisis utilizadas. En el caso del diclofenaco, Q corresponde a la transición 294 > 250, mientras que para q se suele utilizar la transición 296 > 252.^{2,8} Puesto que el compuesto marcado contiene impurezas de diclofenaco-d₂, que interfieren en la transición 296 > 252, el uso de la relación de las áreas de pico conducirá a Q/q ratios diferentes de las teóricas, lo que puede dar lugar a falsos negativos. Como la aplicación de regresión lineal múltiple permite calcular la contribución de cada perfil isotópico en la transición interferida, este procedimiento también se puede utilizar para restar la contribución del compuesto marcado en la transición 296 > 252:

$$\begin{bmatrix} A_{cal}^{294>250} \\ A_{cal}^{296>252} \\ A_{cal}^{298>254} \end{bmatrix} = \frac{\begin{bmatrix} A_{mix}^{294>250} \\ A_{mix}^{296>252} \\ A_{mix}^{298>254} \end{bmatrix} - x_{lab} \begin{bmatrix} A_{lab}^{294>250} \\ A_{lab}^{296>252} \\ A_{lab}^{298>254} \end{bmatrix}}{x_{nat}} \quad (5)$$

donde $A_{cal}^{i>j}$ son las abundancias calculadas de diclofenaco natural en la muestra.

De manera que la relación $A_{cal}^{294>250} / A_{cal}^{296>252}$ proporcionaría el valor correcto de Q/q ratio. Para verificar este punto, se inyectaron mezclas con diferentes proporciones de diclofenaco natural y diclofenaco-d₄ y se calcularon las Q/q ratios, comparando los resultados con los obtenidos al utilizar la relación de áreas de pico. Tal y como se

esperaba, sólo fue posible confirmar la presencia del analito en la totalidad de las muestras haciendo uso del procedimiento propuesto.

La validación de la metodología se llevó a cabo con el análisis de agua superficial, agua residual y agua residual depurada fortificada con 1 ng g^{-1} de diclofenaco ($n = 3$ e inyectadas por triplicado), incluyendo una etapa de preconcentración con SPE. En estas condiciones, la concentración de analito endógeno presente en las muestras "blanco" de agua residual (previamente analizada) se restó a la de la muestra fortificada. Las recuperaciones estuvieron comprendidas entre 90-110% para todas las matrices estudiadas. Los resultados se compararon con los obtenidos al seleccionar los iones moleculares desprotonados sin fragmentar (ecuación 1). En este caso, las recuperaciones para el agua residual y residual depurada no fueron satisfactorias, debido a la coelución de compuestos isobáricos presentes en estas matrices complejas. Esto pone de manifiesto la necesidad de aplicar el procedimiento de regresión lineal a los iones producto para alcanzar la selectividad requerida en este tipo de muestras. La incertidumbre total combinada para cada réplica se calculó siguiendo el procedimiento de Kragten basado en hojas de cálculo.¹³ Cabe señalar que, a diferencia de las estrategias de calibrado clásico, para utilizar el procedimiento desarrollado es necesario conocer exactamente la concentración y extensión del enriquecimiento del compuesto marcado, los cuales contribuyen a la incertidumbre combinada total. En todo caso, se observó que la principal fuente de incertidumbre procede de la medida de las abundancias isotópicas experimentales, dando lugar a RSDs de alrededor del 5%.

Por último, es importante mencionar que el uso de la presente metodología abre las puertas al marcaje isotópico mínimo del analito, lo cual minimizaría la extensión de los posibles efectos isotópicos y en consecuencia proporcionaría determinaciones más exactas para muestras de matriz compleja.

4.2.1. Bibliografía

1. Skoutakis, V.A.; Carter, C.A.; Mickle, T.R.; Smith, V.A.; Arkin, C.R.; Alissandratos, J.; Petty, D.E. *Review of diclofenac and evaluation of its place in therapy as a nonsteroidal antiinflammatory agent*. Drug Intell. Clin. Pharm. **1988**, 22, 850-859.
2. Gracia-Lor, E.; Sancho, J.V.; Hernández, F. *Simultaneous determination of acidic, neutral and basic pharmaceuticals in urban wastewater by ultra high-pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. J. Chromatogr. A **2010**, 1217, 622-632.
3. Richardson, S.D. *Environmental mass spectrometry: emerging contaminants and current issues*. Anal. Chem. **2010**, 82, 4742-4774.
4. Letzel, M.; Metzner, G.; Letzel, T. *Exposure assessment of the pharmaceutical diclofenac based on long-term measurements of the aquatic input*. Environ. Int. **2009**, 35, 363-368.
5. Cleuvers, M. *Mixture toxicity of the anti-inflammatory drugs diclofenac, ibuprofen, naproxen, and acetylsalicylic acid*. Ecotoxicol. Environ. Saf. **2004**, 59, 309-315.
6. Kasprzyk-Hordern, B.; Dinsdale, R.M.; Guwy, A.J. *The effect of signal suppression and mobile phase composition on the simultaneous analysis of multiple classes of acidic/neutral pharmaceuticals and personal care products in surface water by solid-phase extraction and ultra performance liquid chromatography-negative electrospray tandem mass spectrometry*. Talanta **2008**, 74, 1299-1312.
7. Hernando, M.D.; Heath, E.; Petrovic, M.; Barceló, D. *Trace-level determination of pharmaceutical residues by LC-MS/MS in natural and treated waters. A pilot-survey study*. Anal. Bioanal. Chem. **2006**, 395, 985-991.
8. Gracia-Lor, E.; Sancho, J.V.; Hernández, F. *Multi-class determination of around 50 pharmaceuticals, including 26 antibiotics, in environmental and wastewater samples by ultra high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. J. Chromatogr. A **2011**, 1218, 2264-2275.
9. López-Serna, R.; Petrovic, M. Barceló, D. *Development of a fast instrumental method for the analysis of pharmaceuticals in the environmental and wastewaters*

based on ultra high performance liquid chromatography (UHPLC)–tandem mass spectrometry (MS/MS). *Chemosphere* **2011**, 85, 1390-1399.

10. Capdeville, M.J.; Budzinski, H. *Trace-level analysis of organic contaminants in drinking waters and groundwaters*. *Trends Anal. Chem.* **2011**, 30, 586-606.
11. Lin, K.; Gan, J. *Sorption and degradation of wastewater-associated non-steroidal anti-inflammatory drugs and antibiotics in soils*. *Chemosphere* **2011**, 83, 240-246.
12. Magnér, J.A.; Alsberg, T.E.; Broman, D. *Bag-SPE—a convenient extraction method for screening of pharmaceutical residues in influent and effluent water from sewage treatment plants*. *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, 395, 1481-1489.
13. Kragten, J. *Calculating standard deviations and confidence intervals with a universally applicable spreadsheet technique*. *Analyst* **1994**, 119, 2161-2165.

4.2.2. Artículo científico 6

"Isotope pattern deconvolution-tandem mass spectrometry for calibration-free quantification in organic analysis. Application to the determination and confirmation of diclofenac in wastewaters"

A. Castillo, E. Gracia-Lor, A.F. Roig-Navarro, J.V. Sancho, P. Rodríguez-González and J.I. García Alonso.

Elsevier Editorial System(tm) for Analytica Chimica Acta
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: ISOTOPE PATTERN DECONVOLUTION-TANDEM MASS SPECTROMETRY FOR CALIBRATION-FREE QUANTIFICATION IN ORGANIC ANALYSIS. APPLICATION TO THE DETERMINATION AND CONFIRMATION OF DICLOFENAC IN WASTEWATERS

Article Type: Full Length Article

Section/Category: MASS SPECTROMETRY

Keywords: Isotope Pattern Deconvolution; Tandem Mass Spectrometry; Isotope Dilution Mass Spectrometry; Calibration-free determination; Diclofenac

Corresponding Author: Dr. J. Ignacio García Alonso, PhD

Corresponding Author's Institution: University of Oviedo

First Author: J. Ignacio García Alonso, Ph.D.

Order of Authors: J. Ignacio García Alonso, Ph.D.; Ángel Castillo; Emma Gracia-Lor; Juan V Sancho, Ph.D.; Pablo Rodríguez-González, Ph.D.; Antoni Francesc Roig-Navarro, Ph.D.

Suggested Reviewers: Ellen Stokvis

apess@slz.nl

All the reviewers suggested are authors with references cited in manuscript due to their expertise in IDMS

Jaap Wieling

jaap.wieling@xendo.nl

Nobuyasu Itoh

nobuyasu-ito@aiist.go.jp

Barbara Kasprzyk-Hordern

bkasprzy@glam.ac.uk

Isotope pattern deconvolution-tandem mass spectrometry for calibration-free quantification in organic analysis. Application to the determination and confirmation of diclofenac in wastewaters

A. Castillo¹, E. Gracia-Lor¹, A.F. Roig-Navarro¹, J.V. Sancho¹, P. Rodríguez-González², J.I. García Alonso²

¹Research Institute for Pesticides and Water, Universitat Jaume I, E-12071 Castelló, Spain

²Department of Physical and Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Oviedo, Julián Clavería 8, 33006 Oviedo, Spain

ABSTRACT

In this work, Isotope Dilution Mass Spectrometry (IDMS) in combination with Isotope Pattern Deconvolution (IPD) has been applied to MS/MS (QqQ) in order to carry out the quantification and confirmation of diclofenac in complex matrix water samples without the use of any methodological IDMS calibration graph. In this alternative approach, the isotope composition of the spiked sample is measured after fragmentation by SRM and deconvoluted into its constituting components (molar fractions of natural abundance and labeled compound) by multiple linear regression (IPD). This procedure allows spectral overlap between both clusters and does not require the establishment of an IDMS calibration graph. The procedure has been evaluated for the determination of the pharmaceutical diclofenac in effluent and influent urban wastewaters and fortified surface waters by UHPLC(ESI)MS/MS using diclofenac-d₄ as labeled compound. Calculations were performed acquiring a part and the whole fragment cluster ion, achieving in all cases recoveries within 90-110% and coefficients of variation values below 5% for all water samples tested. In addition, potential false negatives arising from the presence of diclofenac-d₂ impurities in the labeled compound were avoided when the proposed approach was used instead of the classical IDMS calibration procedure. Finally, the number of SRM transitions measured was minimized to three to make possible the application of this alternative technique in routine multi-residue analysis.

INTRODUCTION

Mass spectrometry has been widely accepted as the main tool in the identification, structural characterization and quantitative determination of organic pollutants in food and environmental samples. Nowadays, GC-MS equipped with a single quadrupole (Q) is widely applied to the quantification and confirmation of pre-target non-polar, volatile and semi-volatile compounds. However, the determination of semi-polar and polar compounds is usually performed by LC-MS/MS with triple quadrupole (QqQ) in the Selected Reaction Monitoring (SRM) mode. The main limitation of these methods for quantitative purposes are the non-quantitative steps during sample preparation in GC-MS (such as derivatization), and the ion suppression/enhancement caused by matrix components when using an LC-MS/MS electrospray ion source (ESI). The use of stable isotopically labeled compounds as internal standards (deuterated or ^{13}C -labeled) is normally the preferred strategy to correct for such problems¹ and these IDMS methodologies are increasingly being implemented in routine testing laboratories. The classical procedure in organic IDMS involves the preparation of a calibration graph in which the labeled compound is used as internal standard. However, for routine testing laboratories, IDMS procedures which do not require the construction of a calibration graph would be welcome.

One of these IDMS procedures that do not require calibration graphs is Isotope Pattern Deconvolution (IPD). This procedure has been previously applied for the evaluation of cluster purity²⁻⁴ in organic Mass Spectrometry, for elemental analysis⁵⁻⁶ and trace element speciation⁷⁻⁹ and for metabolism studies.¹⁰⁻¹³ Briefly, Isotope Pattern Deconvolution is based on the determination of the molar fractions for each pure isotope pattern (natural abundance or labeled) contributing to the isotope pattern observed in the mixture of natural (native) and labeled analyte (added) by multiple least squares. This alternative approach does not require any methodological calibration graph and allows the spectral overlap between natural and labeled clusters. In addition, as more isotopes than those strictly required for isotope dilution analysis can be included in the calculation, the extra degrees of freedom can be used to correct for interferences in the mass spectrum.^{5,6,14} In the case of molecular Mass Spectrometry, mass isotopomer distributions resulting from the contribution of the different isotopes of each element in the molecule are used instead of elemental isotope abundances.¹⁵ Recently, IDMS in combination with IPD has been applied to GC-MS (Q) using organic compounds labeled with isotopically enriched mercury,¹⁶ bromine¹⁷ and ^{13}C .¹⁸ However, the application of IPD for organic compounds with tandem mass spectrometry has not been reported yet. The fact that the mass isotopomer distribution in the molecule changes during fragmentation has to be taken into

account for the application of IPD in tandem mass spectrometry. For the development of the HPLC-ID-MS/MS procedure we have selected diclofenac as model compound.

Diclofenac is a widely consumed pharmaceutical that has been observed in urban wastewater effluents at concentration levels in the range of high ng L⁻¹ or low µg L⁻¹,¹⁹ which are enough to induce chronic toxicity in fish.¹ Normally, an off-line preconcentration step by solid-phase extraction (SPE) is required to reach the sensitivity necessary to detect the above mentioned concentrations of diclofenac.²⁰⁻²³ However, some matrix components coming from the waste water samples are also preconcentrated and may co-elute with the analyte, leading to ion suppression in the ESI-based MS detection.¹⁹ Additionally, spectral overlap between natural abundance and labeled diclofenac pose some difficulties in the determination of this compound by classical IDMS.¹⁹ In this paper, we have evaluated the application of IPD with tandem MS (QqQ) both for quantitation and confirmation purposes. The analytical figures of merit of the proposed methodology were compared with those obtained by the classical IDMS procedure. The validation of the methodology was carried out by analyzing surface water, effluent wastewater and influent wastewater samples, with only three SRM transitions required, not to compromise the simultaneous determination of other compounds during the same chromatographic run.

EXPERIMENTAL SECTION

Instrumentation

UHPLC analysis was carried out using an Acquity UPLC system (Waters Corp., Milford, MA, USA), equipped with a binary solvent manager and a sample manager. For the chromatographic separation, an Acquity UPLC BEH column 1.7 µm, 50 mm x 2.1 mm (i.d.) (Waters) at a flow rate of 0.3 mL min⁻¹ was employed. The column was kept at 60 °C and the sample manager was maintained at 5 °C. Mobile phase consisted of water/methanol gradient both 0.1 mM NH₄Ac and 0.01% HCOOH. The methanol percentage changed linearly as follows: 0 min, 5%; 1.5 min, 5%; 2 min, 30%; 3 min, 50%; 5 min, 70%; 6 min, 90%; 7.1 min, 5%. Analysis run time was 9 min. Mobile phases were filtered under vacuum through 0.22 µm nylon membrane filters. Under these conditions d₄-labeled and unlabeled diclofenac eluted after 5.51 and 5.53 min, respectively.

A TQD (quadrupole-hexapole-quadrupole) tandem mass spectrometer with an orthogonal Z-spray-electrospray interface (Waters) was used for UHPLC analysis. Drying gas as well as nebulizing gas was nitrogen generated from pressurized air in a N₂ LC-MS (Claind,

Teknokroma, Barcelona, Spain). Cone gas and desolvation gas flows were set at 60 L h⁻¹ and 1200 L h⁻¹, respectively. For operation in MS/MS mode, collision gas was Argon 99.995% (Praxair, Valencia, Spain) with a pressure of 2 x 10⁻³ mbar in the T-Wave collision cell. Capillary voltage was -3.0 kV in the negative ionization mode. Interface temperature and source temperature were optimized at 500 and 120 °C, respectively. Dwell times of 10 ms scan were selected for each SRM transition. Masslynx 4.1 (Micromass, Manchester, UK) software was used to process quantitative data.

Reagents and Materials

The pharmaceutical natural abundance diclofenac and isotopically labeled diclofenac-d₄ (92.8% enrichment) were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany) and CDN Isotopes (Quebec, Canada), respectively. Stock solutions were prepared by dissolving the corresponding standards in methanol (Scharlau, Barcelona, Spain). All stock solutions were stored at 4 °C and employed to prepare daily gravimetrically diluted working standard solutions in methanol. The concentration of the labeled diclofenac was determined by microLC(ICP)MS, using external calibration with natural abundance diclofenac, and detecting chlorine at mass 35. Also, the deuterium enrichment of the labeled diclofenac was checked using UHPLC(ESI)MS/MS in the pseudo-SRM approach. HPLC-grade water was obtained by purifying demineralized water in a Milli-Q gradient A10 (Millipore, Bedford, MA, USA). Formic acid (HCOOH, content >98%) and ammonium acetate (NH₄Ac, reagent grade) were supplied by Scharlau (Barcelona, Spain). SPE cartridge used was Oasis HLB (60 mg) from Waters.

Procedures

Extraction of the Pharmaceutical from Water

All influent (IWW) effluent (EWW) and surface water samples (SW) with observable suspended particulate matter were centrifuged at 4500 rpm for 5 min before loading the SPE cartridges. Oasis HLB cartridges were previously conditioned with 3 mL of methanol and 3 mL of HPLC-grade water. 100 mL of water sample were spiked with an appropriate amount of the labeled diclofenac standard according to the random error propagation theory.²⁴ The IWW samples were diluted five times due to their high complexity and elevated organic matter content. In order to correct for volumetric errors, the amount of sample and spike added were determined gravimetrically. Then, the sample was passed through the cartridge by gravity (flow rate around 3 mL min⁻¹). After drying under vacuum, analytes were eluted with 5 mL of methanol. The extract was evaporated to dryness under a gentle nitrogen stream (40 °C) and finally

reconstituted with 1 mL methanol-water (10:90). Analysis was carried out by injecting 20 μL of the final extract in the UHPLC-MS/MS system.

Measurement of Mass Isotopomer Distributions

For initial qualitative analyses, full-scan and product ion scan mass spectra were performed by direct infusion of 1 mg L^{-1} methanol/water (50:50, v/v) of the compounds at 10 $\mu\text{L min}^{-1}$. Quantitative analyses were carried out on the deprotonated molecular cluster $[\text{M-H}]^-$ and on the fragment cluster ion $[(\text{M-H})-44]^-$ (loss of the carbon dioxide group), using pseudo-SRM and SRM mode, respectively. In pseudo-SRM, the precursor ion is measured after application of a fragmentation voltage which may induce the fragmentation of interfering compounds but not the analyte, resulting in less background noise than SIM mode. Experimental MS conditions are summarized in Table S-1 (supporting information). The isotope patterns were determined dividing the peak area obtained for each transition (10 or 3 transitions) by the sum of all peak areas measured. To evaluate measurement variability each sample was always injected by triplicate.

Determination and Confirmation of Diclofenac by IDMS with Isotope Pattern Deconvolution

For the final determination and confirmation of diclofenac three transitions were employed: 294 > 250, 296 > 252 and 298 > 254. The isotope patterns measured in the spiked samples were deconvoluted into the molar fractions of natural abundance and labeled diclofenac (x_{nat} and x_{lab}) by multiple least squares using the equation:

$$\begin{bmatrix} A_{\text{mix}}^{294>250} \\ A_{\text{mix}}^{296>252} \\ A_{\text{mix}}^{298>254} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} A_{\text{nat}}^{294>250} & A_{\text{lab}}^{294>250} \\ A_{\text{nat}}^{296>252} & A_{\text{lab}}^{296>252} \\ A_{\text{nat}}^{298>254} & A_{\text{lab}}^{298>254} \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} x_{\text{nat}} \\ x_{\text{lab}} \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} e^{294>250} \\ e^{296>252} \\ e^{298>254} \end{bmatrix} \quad (1)$$

Where the $A_{\text{mix}}^{i>j}$ values corresponds to the measured relative abundance of the compound in the mixture for the SRM transition of nominal masses $i > j$ and the $A_{\text{nat}}^{i>j}$ and $A_{\text{lab}}^{i>j}$ values the theoretically calculated or experimentally measured abundances for the natural and labeled diclofenac, respectively. The amount (mols) of natural abundance diclofenac in the sample, N_{nat} , is then calculated using equation (2) where the amount (mols) of labeled diclofenac added, N_{lab} , must be known.

$$N_{\text{nat}} = N_{\text{lab}} \frac{x_{\text{nat}}}{x_{\text{lab}}} \quad (2)$$

For the confirmation of the presence of diclofenac in the samples the Q/q ratios must be computed. For this purpose, the contribution of the labeled diclofenac in the natural diclofenac transitions should be subtracted. The calculated abundances for natural abundance diclofenac in the sample, $A_{cal}^{i>j}$, are determined using the previously calculated molar fractions according to the following expression:

$$\begin{bmatrix} A_{cal}^{294>250} \\ A_{cal}^{296>252} \\ A_{cal}^{298>254} \end{bmatrix} = \frac{\begin{bmatrix} A_{mix}^{294>250} \\ A_{mix}^{296>252} \\ A_{mix}^{298>254} \end{bmatrix} - x_{lab} \begin{bmatrix} A_{lab}^{294>250} \\ A_{lab}^{296>252} \\ A_{lab}^{298>254} \end{bmatrix}}{x_{nat}} \quad (3)$$

Then, the Q/q ratio $A_{cal}^{294>250} / A_{cal}^{296>252}$ –corrected for the spectral overlap from the labeled compound in the spiked sample– are compared with the Q/q ratio of natural abundance diclofenac $A_{nat}^{294>250} / A_{nat}^{296>252}$.

RESULTS AND DISCUSSION

For the application of IPD in organic IDMS there are two new requirements that did not need to be considered in classical IDMS: the isotope distribution of both the natural and labeled compound must be calculated theoretically (or determined experimentally) and the concentration of the labeled compound added to the sample must be known accurately.¹⁸ These two requirements add some extra work during method development, in contrast to classic IDMS, but the effort pays off with a much faster routine procedure as the methodological calibration graph is no longer required.

Isotope Distribution of Diclofenac with Tandem Mass Spectrometry

In organic IDMS, the sample containing the natural abundance analyte is spiked with the isotope-labeled internal standard, which is traditionally enriched with ^{13}C or ^2H . Thus, the resulting mass isotopomer distribution will be a mixture of the natural and labeled isotope patterns. However, when the internal standard is not pure enough and/or in the presence of atoms with various highly abundant isotopes, the natural and labeled isotope clusters may overlap.

This is the case of the determination of diclofenac using an isotopically labeled diclofenac enriched in four deuterium atoms (diclofenac- d_4). As illustrated in Figure 1, the natural abundance compound provides a deprotonated cluster ion between m/z 294 to 299 owing to

the presence of two chlorine atoms in the structure. Diclofenac-d₄, in turn, originates an isotope pattern ranging from 296 to 303 because the extent of d₄-labeling is not 100%. In other words, the labeled compound contains small amounts of diclofenac-d₂ and d₃. The resulting cross-talk at *m/z* 298 affects the most sensitive ion of the internal labeled standard, leading to a non-linear calibration graph when plotting the intensity ratio I_{294}/I_{298} vs the molar ratio of the natural abundance and labeled analogues (see Figure S-1, Supporting Information). To overcome such a problem, another non interfered ion from the internal standard cluster can be selected to build the classical IDMS calibration graph. Also, molar balances for all molecular or in source fragment ions measured can be established as a function of natural abundance and the isotopically labeled compound to correct for this contribution, as it was performed by isotope dilution GC-EI-MS (Q) in selective ion monitoring (SIM).¹⁸ The system of equations obtained from those molar balances can be solved by multiple linear regression applying a least square fitting as shown in the procedures.

Theoretical Considerations

When tandem mass spectrometry (QqQ) in Selected Reaction Monitoring (SRM) mode is used, the different isotope compositions coming from the same nominal mass could generate fragment ions with various nominal masses, leading to a mass isotopomer distribution different from the original deprotonated ion. This situation is better explained for natural abundance diclofenac in Figure 2, where the loss of the carbon dioxide group of the molecule is selected for quantification.¹⁹ As can be seen, the precursor ion at *m/z* 294 originates a single product ion (*m/z* = 250). Indeed, since such a precursor ion is constituted of $^{12}\text{C}_{14}^1\text{H}_{10}^{14}\text{N}^{16}\text{O}_2^{35}\text{Cl}_2$, the only neutral loss feasible will be $^{12}\text{C}^{16}\text{O}_2$ (44 Da). In contrast, if nominal mass 295 is selected two product ions will be observed. This is because the four possible isotope compositions at mass 295: $^{13}\text{C}^{12}\text{C}_{13}^1\text{H}_{10}^{14}\text{N}^{16}\text{O}_2^{35}\text{Cl}_2$, $^{12}\text{C}_{14}^2\text{H}^1\text{H}_9^{14}\text{N}^{16}\text{O}_2^{35}\text{Cl}_2$, $^{12}\text{C}_{14}^1\text{H}_{10}^{15}\text{N}^{16}\text{O}_2^{35}\text{Cl}_2$ and $^{12}\text{C}_{14}^1\text{H}_{10}^{14}\text{N}^{17}\text{O}^{16}\text{O}^{35}\text{Cl}_2$ can lose not only $^{12}\text{C}^{16}\text{O}_2$ (neutral loss of 44 Da) but also $^{13}\text{C}^{16}\text{O}_2$ and $^{12}\text{C}^{17}\text{O}^{16}\text{O}$ (neutral loss of 45 Da), which result in the product ion of mass 250. Similarly, different fragment ions are generated when the masses 296, 297, 298 and 299 are selected in the first quadrupole. If we assume that the fragmentation efficiency does not depend on the isotope composition, the relative abundance of such precursor ions will be distributed among their corresponding product ions. In other words, the sum of the relative abundances for the transitions 295 > 251 and 295 > 250 will be equivalent to the theoretical abundance of precursor ion *m/z* 295 and so on. Obviously, the same reasoning is suitable for diclofenac-d₄, although in this case the low deuterium enrichment of 92.8% produces a higher number of product ions.

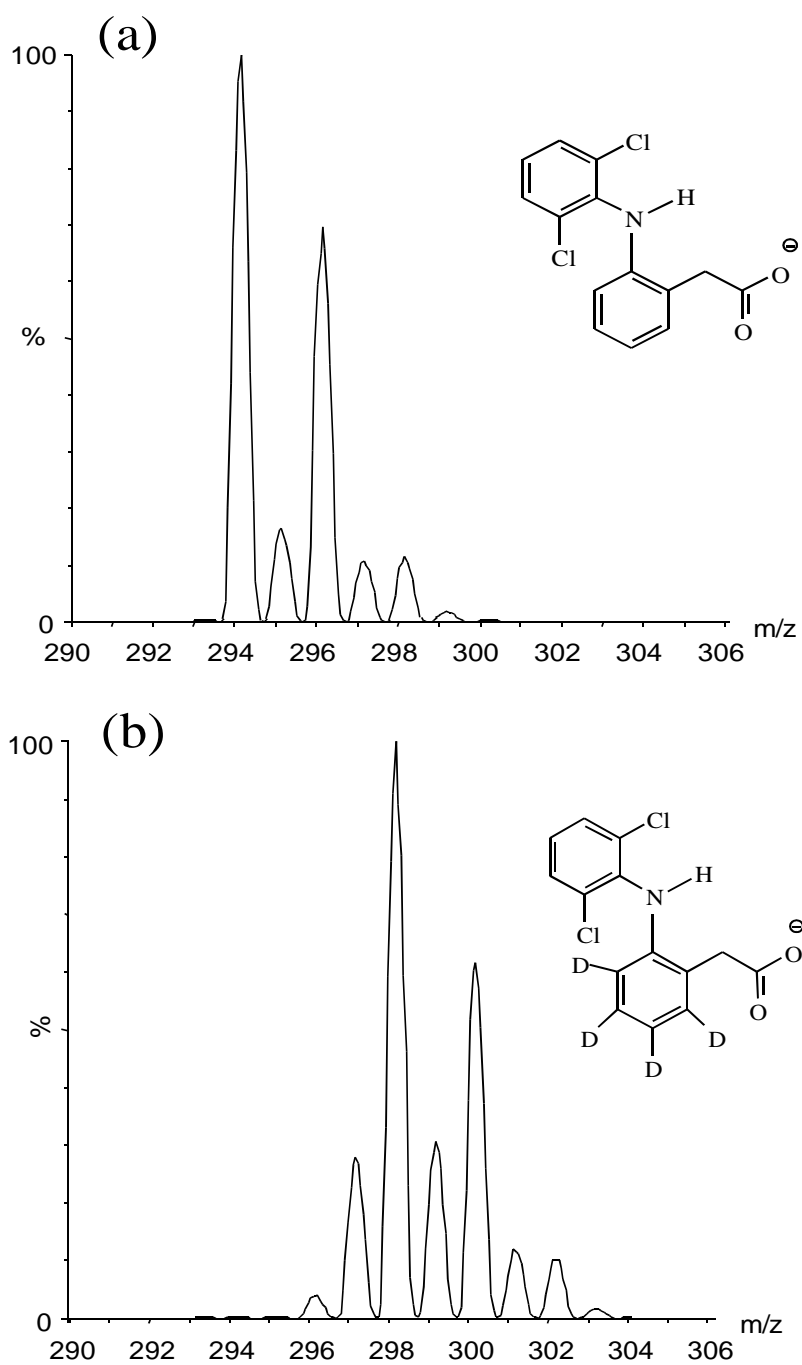


Figure 1. Experimental cluster $[M-H]^-$ using LC-ESI-MS in full-scan for (a) natural diclofenac and (b) diclofenac- d_4 (around $2.5 \mu\text{g g}^{-1}$).

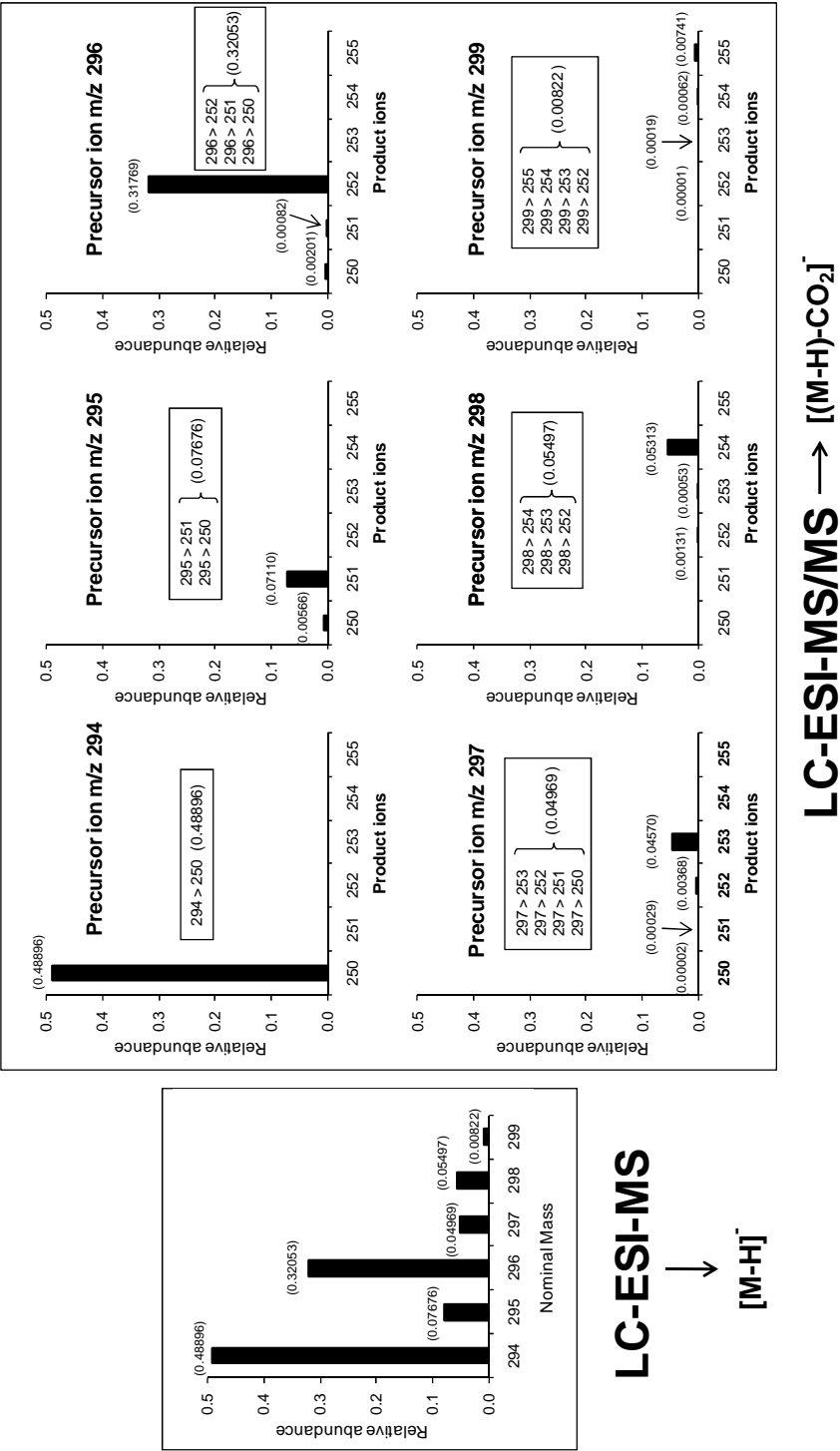


Figure 2. Theoretical isotope composition of the natural abundance diclofenac ionized in negative mode for LC-ESI-MS and LC-ESI-MS/MS in SRM mode.

For the calculation of the theoretical isotope distribution of natural abundance diclofenac after tandem mass spectrometry we can consider only one product ion per precursor ion. Thus, the isotope patterns of both natural and labeled compounds after fragmentation must be calculated theoretically first.²⁵ The number and extent of the generated product ions depend on two factors: the relative abundance of the different isotope compositions and the number of isotopes of the elements involved in the neutral loss of mass. For a better understanding of this approach, the computation of the abundance of SRM transitions $295 > 250$ and $295 > 251$ from natural abundance diclofenac will be described. As it was stated before, from the four possible isotope forms at mass 295 of diclofenac only two isotope compositions can be involved in the formation of the product ion m/z 250 with a neutral loss of 45 Da. These two forms are $^{13}\text{C}_1^{12}\text{C}_{13}^1\text{H}_{10}^{14}\text{N}^{16}\text{O}_2^{35}\text{Cl}_2$ and $^{12}\text{C}_{14}^1\text{H}_{10}^{14}\text{N}^{17}\text{O}^{16}\text{O}^{35}\text{Cl}_2$. On the basis of a mass isotopomer distribution calculation algorithm implemented in Excel,²⁵ the computed relative abundances of those two isotopomers were 0.074034 and 0.00037, respectively. After fragmentation, one carbon and two oxygen atoms are lost. Therefore, in the case of $^{13}\text{C}_1^{12}\text{C}_{13}^1\text{H}_{10}^{14}\text{N}^{16}\text{O}_2^{35}\text{Cl}_2$ there is a probability of 1 to 14 that the ^{13}C atom is placed in the carbon dioxide group. In contrast, the isotope composition $^{12}\text{C}_{14}^1\text{H}_{10}^{14}\text{N}^{17}\text{O}^{16}\text{O}^{35}\text{Cl}_2$ can only provide the product ion m/z 250 because both oxygen atoms are lost. Thereby, the theoretical relative abundance for the transition $295 > 250$ will be $0.074034 \cdot 1/14 + 0.00037 = 0.00566$. Hence, the abundance of mass 251 after the $295 > 251$ transition will be $0.07676 - 0.00566 = 0.07110$ as shown in Figure 2. For deuterated diclofenac the calculation procedure is more arduous since the extent of deuteration has to be taken into account but similar theoretical results can be obtained.

Experimental Measurements

The experimental measurement of the isotope distribution of natural abundance and d₄-labeled diclofenac was carried out for ten different transitions (from $294 > 250$ to $303 > 259$) covering all possible fragments of the natural and labeled compound. Also, the measurement was done at different concentration levels and on different matrices (Milli-Q water, Surface Water, Influent Waste Water and Effluent Waste Water) to evaluate matrix effects and possible spectral interferences. For some matrices the preconcentration using SPE cartridges was also evaluated at a much lower concentration level. The comparison of the theoretical and experimental isotope abundances is shown in Tables 1 and 2 for the natural abundance and d₄-labeled diclofenac, respectively. As it can be observed similar mass isotopomer distributions were obtained in all cases indicating that no spectral interferences were detected in any of the matrices tested and that the QqQ system was able to produce isotope compositions in

agreement with the theoretical values. Based on these data the purity of the fragmentation cluster is also assured.¹⁸

Table 1. Comparison of theoretical and experimental isotope abundances measured for natural abundance diclofenac in different matrices and at different concentration levels. Uncertainties in brackets for the last digits correspond to standard deviation for $n = 3$ injections										
Transition	Theoretical abundances*	Milli-Q water				Surface Water				
		100 ng/g	200 ng/g	500 ng/g	1 ng/g**	1 ng/g**				
294>250	0.49665	0.4952 (19)	0.4813 (10)	0.48238 (25)	0.504 (3)	0.499 (4)				
295>251	0.07222	0.077 (5)	0.079 (4)	0.078 (3)	0.0749 (22)	0.0769 (44)				
296>252	0.32269	0.313 (10)	0.330 (5)	0.3246 (14)	0.319 (4)	0.315 (5)				
297>253	0.04642	0.052 (4)	0.050 (4)	0.0520 (11)	0.0457 (44)	0.0504 (65)				
298>254	0.05397	0.054 (5)	0.0515 (20)	0.055 (4)	0.0502 (35)	0.0514 (22)				
299>255	0.00753	0.009 (3)	0.0086 (14)	0.0083 (3)	0.0062 (17)	0.0070 (16)				
300>256	0.00051	0	0	0	0	0				
301>257	0.00002	0	0	0	0	0				
302>258	0.00000	0	0	0	0	0				
303>259	0.00000	0	0	0	0	0				
Transition	Theoretical abundances*	Effluent Waste Water				Influent Waste Water				
		100 ng/g	200 ng/g	500 ng/g	1 ng/g**	100 ng/g	200 ng/g	500 ng/g	1 ng/g**	
294>250	0.49665	0.478 (5)	0.485 (4)	0.487 (4)	0.496 (2)	0.483 (14)	0.493 (10)	0.493 (10)	0.492 (11)	
295>251	0.07222	0.07760 (5)	0.076 (5)	0.077 (6)	0.0794 (24)	0.078 (7)	0.078 (4)	0.076 (3)	0.075 (8)	
296>252	0.32269	0.33267 (21)	0.3274 (9)	0.3228 (19)	0.317 (6)	0.330 (9)	0.326 (4)	0.318 (10)	0.324 (3)	
297>253	0.04642	0.052 (6)	0.048 (4)	0.0507 (4)	0.0448 (16)	0.048 (4)	0.0505 (22)	0.0514 (7)	0.049 (3)	
298>254	0.05397	0.057 (7)	0.054 (4)	0.055 (4)	0.0531 (19)	0.053 (5)	0.0491 (19)	0.053 (3)	0.054 (6)	
299>255	0.00753	0.004 (5)	0.0092 (16)	0.00793 (21)	0.0095 (14)	0.0088 (4)	0.004 (6)	0.00787 (5)	0.006 (3)	
300>256	0.00051	0	0	0	0	0	0	0	0	
301>257	0.00002	0	0	0	0	0	0	0	0	
302>258	0.00000	0	0	0	0	0	0	0	0	
303>259	0.00000	0	0	0	0	0	0	0	0	

* Normalized to $\sum A_i = 1$.
** After preconcentration using SPE cartridges.

Table 2. Comparison of theoretical and experimental isotope abundances measured for d₄-labeled diclofenac in different matrices and at different concentration levels. Uncertainties in brackets for the last two digits correspond to standard deviation for $n = 3$ injections

Transition	Theoretical abundances*	Milli-Q water				Surface Water	
		100 ng/g	200 ng/g	500 ng/g	1 ng/g**	1 ng/g**	
294>250	0.00001	0	0	0	0	0	
295>251	0.00069	0	0	0	0	0	
296>252	0.01342	0.0136 (4)	0.0148 (4)	0.0144 (5)	0.015 (3)	0.014 (3)	
297>253	0.11679	0.117 (5)	0.109 (5)	0.111 (5)	0.111 (5)	0.121 (3)	
298>254	0.39396	0.386 (7)	0.388 (7)	0.392 (4)	0.394 (12)	0.392 (13)	
299>255	0.12908	0.133 (4)	0.130 (4)	0.129 (4)	0.132 (11)	0.131 (7)	
300>256	0.25162	0.248 (7)	0.253 (11)	0.250 (12)	0.257 (5)	0.247 (14)	
301>257	0.04697	0.05812 (10)	0.057 (3)	0.0557 (6)	0.047 (4)	0.0481 (22)	
302>258	0.04177	0.042 (5)	0.0407 (25)	0.0411 (18)	0.039 (3)	0.0426 (11)	
303>259	0.00568	0.003 (4)	0.0061 (5)	0.0061 (4)	0.0056 (18)	0.0042 (14)	
Transition	Theoretical abundances*	Effluent Waste Water			Influent Waste Water		
		100 ng/g	200 ng/g	500 ng/g	100 ng/g	200 ng/g	500 ng/g
294>250	0.00001	0	0	0	0	0	0
295>251	0.00069	0	0	0	0	0	0
296>252	0.01342	0.0159 (5)	0.0148 (14)	0.0153 (5)	0.01439 (6)	0.01514 (4)	0.01535 (8)
297>253	0.11679	0.10928 (22)	0.111 (3)	0.1113 (11)	0.1144 (5)	0.1161 (24)	0.11263 (19)
298>254	0.39396	0.395 (4)	0.3859 (21)	0.388 (13)	0.379 (11)	0.386 (12)	0.387 (10)
299>255	0.12908	0.129 (5)	0.129 (7)	0.134 (4)	0.131 (3)	0.130 (3)	0.134 (3)
300>256	0.25162	0.248 (10)	0.252 (8)	0.247 (12)	0.250 (9)	0.248 (8)	0.246 (9)
301>257	0.04697	0.057805 (3)	0.0585 (24)	0.0557 (10)	0.0600 (7)	0.0559 (12)	0.0568 (3)
302>258	0.04177	0.042 (4)	0.0427 (16)	0.0415 (25)	0.045 (3)	0.0422 (23)	0.042 (3)
303>259	0.00568	0.003 (4)	0.0066 (8)	0.0064 (5)	0.0065 (10)	0.0063 (4)	0.0068 (7)

* Normalized to $\sum A_i = 1$.

** After preconcentration using SPE cartridges.

Determination of the Concentration of Diclofenac-d₄ by HPLC-ICPMS

In organic IDMS the labeled analyte is traditionally used as internal standard, so an accurate certification of the labeled compound is not strictly required. However, in the proposed approach the concentration of the labeled compound is required.¹⁸ Therefore, before examining possible isotope effects in LC(ESI)MS/MS the concentration of the standard stock solution of the

labeled analyte was determined by HPLC-ICPMS using the chlorine signal at mass 35 for quantification. When using ICPMS the molecules break down into its constituting atoms, which are then ionized to form a single charged ion. In that way, the measurement of the chlorine signal coming from the analyte (m/z 35) will provide the total amount of chlorine contained in the sample. Next, the concentration of the compound can be easily calculated taking into account the stoichiometry of the molecule. According to this, the standard stock solution of diclofenac- d_4 was diluted at three different levels and injected in the microLC(ICP)MS by triplicate. The quantification was carried out by external calibration using natural abundance diclofenac standard solutions containing chlorine concentrations ranging from 10 to 50 $\mu\text{g g}^{-1}$ (five-point calibration curve and three independent injections). The obtained concentration for the stock solution of labeled diclofenac was $291 \pm 5 \mu\text{g g}^{-1}$, with a linear correlation coefficient greater than 0.999.

Evaluation of Possible Isotope Effects between Natural Abundance and Isotopically Labeled Diclofenac

Although isotope-labeled internal standards are assumed to provide identical physicochemical properties than the analyte, unexpected results have been reported when using deuterated compounds. Indeed, several authors observed lower retention times for the deuterated internal standards in reversed-phase LC.²⁶⁻³¹ In such a case, co-eluting interferences does not affect equally to natural and labeled analyte and matrix effects cannot be properly corrected. On the other hand, different recoveries during analytical processes were noticed by Itoh et al.³² for PAHs using GC-MS detection. As a result, special attention should be paid when deuterated internal standards are employed. In this sense, the behavior of the selected isotopically enriched diclofenac- d_4 was studied in order to rule out any isotopic effect during the determination.

As it was stated above, the multiple linear regression calculations provide the molar fractions x_{nat} and x_{lab} in the spiked sample, unless isotope effects occur. Thereby, the plot of the ratio of molar fractions vs. the ratio of molar concentrations should give a straight line of slope 1 and intercept 0. Consequently, any deviation of this theoretical graph would suggest a different behavior between the unlabeled and labeled analyte. Taking this into consideration, increasing concentrations (0-250 ng g^{-1}) of natural diclofenac in Milli-Q water containing 100 ng g^{-1} of the labeled analogue were injected in triplicate through the LC(ESI)MS. Acquisition was accomplished both in pseudo-SRM and SRM mode to discard any isotopic effect during fragmentation. Results are shown in Figure 3 including a reference line of slope 1 and intercept 0

for comparison. The black data points were calculated from the deprotonated molecular ion pattern (circles, 10 masses; triangles, masses 294, 296 and 298 employed) while the white data points were computed from the pattern obtained after carbon dioxide loss (circles, 10 SRM transitions; triangles, SRM transitions 294 > 250, 296 > 252 and 298 > 254). As can be seen, every point is close to the theoretical line of slope 1 and intercept 0 for both patterns. That means that no isotope effects were noticed during the ionization and/or the ion transmission and the fragmentation of the labeled and unlabeled compound. As a consequence, it seems that calibration-free IDMS measurements can be performed for the quantification of diclofenac. Furthermore, when comparing the measurement of 3 or 10 transitions (circles and triangles) no significant differences were observed, which means that satisfactory results using the proposed approach could be attained with the same number of acquisitions as classical IDMS (including the confirmation transition).

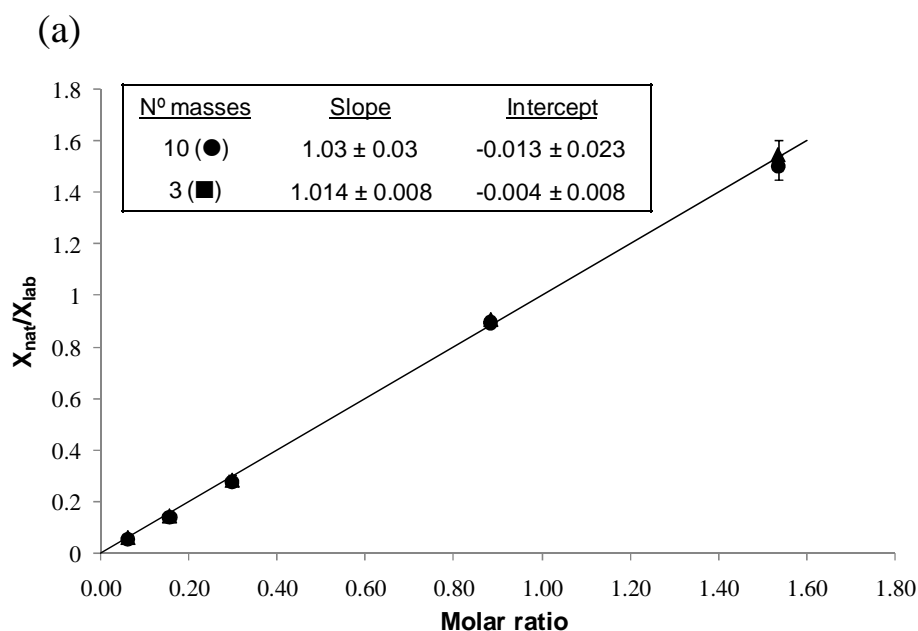


Figure 3. Application of Isotope Pattern Deconvolution in IDMS for the determination of diclofenac using diclofenac- d_4 . The molar fractions were calculated using UHPLC-ESI-MS/MS in (a) pseudo-SRM (● and ▲) as well as (b) SRM (△ and ○). The line corresponds to a slope of 1 and intercept of 0.

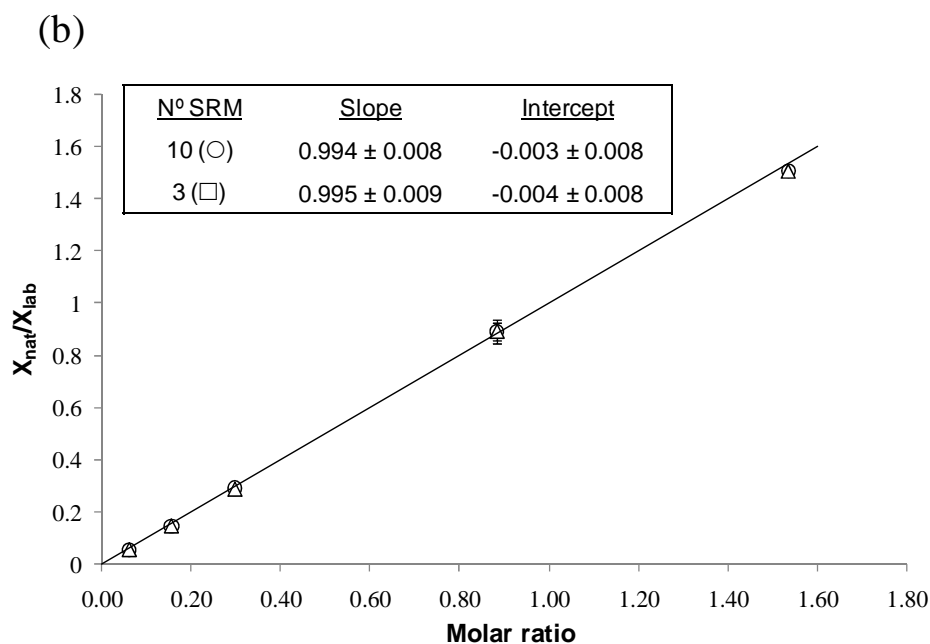


Figure 3. (continuation)

Finally, a preliminary study of the accuracy of the proposed methodology was carried out using fortified influent waste water sample containing around 100 ng g^{-1} of unlabeled and labeled diclofenac, without SPE preconcentration. Once again, acquisitions were achieved both in pseudo-SRM and SRM mode. Results were compared with those obtained using internal calibration. To this end, the non-interfered ion $m/z = 300$ of the labeled compound was selected to build the classical IDMS calibration graph. Satisfactory recoveries were obtained when using the calibration-free isotope dilution analysis procedures, which did not differ statistically from the classical internal calibration procedure (see Table S-2, Supporting Information).

Use of Multiple Least Squares in Confirmation of Positive Findings

In the line of EU Decision 2002/657/EC³³⁻³⁴, the sample is considered positive when the experimental ion-ratio between the quantification (Q) and the confirmation (q) transitions fell within the tolerance range. However, in the case of diclofenac the mass overlap between the natural and isotopically enriched compound affects the precursor ion $m/z 296$ usually selected for confirmation purposes.¹⁹ Such contribution becomes critical as the molar fraction of the unlabeled compound decreases, which may lead to false negatives. Once more, the application of multiple least squares could deconvolute the interfered ion signal into its constituting components, providing the corrected value of the Q/q ratio. To prove this point,

standard solutions with different concentration ratio of labeled and unlabeled diclofenac were analyzed both in pseudo-SRM and SRM mode ($n = 3$). The presence of the analyte was then confirmed using the raw peak area ratios and the proposed approach (equation (3)). As can be seen in Figure 4, the lower concentration ratios of natural and labeled diclofenac could not be confirmed for peak area ratios since the corresponding values fall outside the tolerance range. On the other hand, when IPD was used the compliance of the Q/q ratios was achieved in all cases. Indeed, the contribution arising from diclofenac- d_4 in the q transition could be corrected accurately taken into account the mass isotopomer distributions. It is worth noting that in this case, due to the Q/q ratio selected arises from the ion pattern of the two chlorine atoms of the molecule, the theoretical Q/q ratio value can be calculated using the above mentioned Visual Basic macro²⁵ without requiring any reference standard. According to these observations, the use of multiple least squares could make possible a better confidence on confirmation for overlapped clusters of the natural abundance compound.

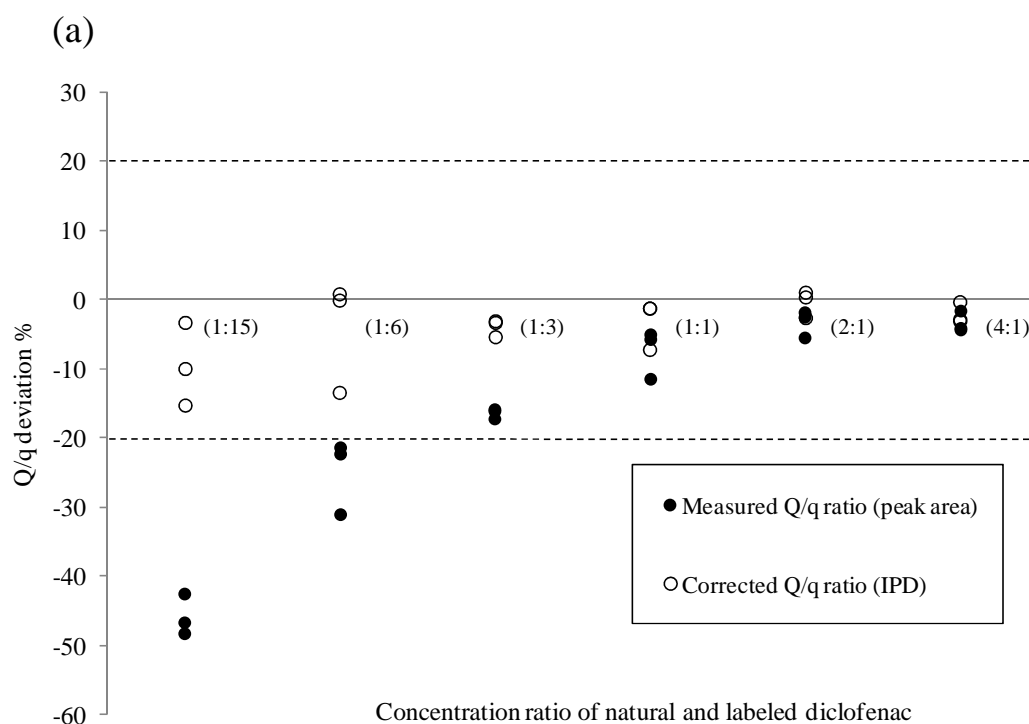


Figure 4. Application of Isotope Pattern Deconvolution to correct the contribution of the labeled diclofenac in the confirmation transition (q) using UHPLC-ESI-MS/MS in (a) pseudo-SRM (Q: 294 > 294, q: 296 > 296) and (b) SRM (Q: 294 > 250, q: 296 > 252).

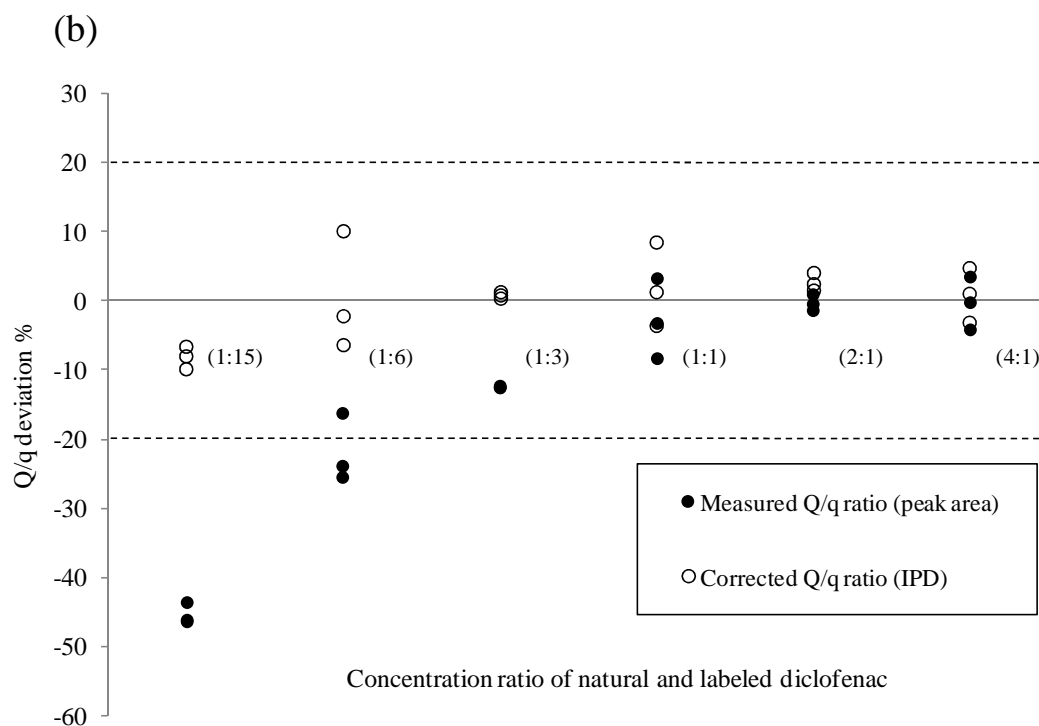


Figure 4. (continuation)

Method Validation

The proposed linear regression procedure was evaluated in three types of water samples (SW, EWW and IWW). Accuracy was estimated from recovery experiments of the target compound at a concentration around 1 ng g^{-1} . In this case, a SPE pre-concentration step was included to reach the sensitivity necessary to detect the endogenous concentrations present in environmental samples. Under such circumstances it was not feasible to get a true blank for EWW and IWW, as the different samples previously analyzed contained the sought compound.¹⁹ Thus, the concentrations of the analyte found in the "blank" samples were subtracted from the spiked samples, despite the higher errors in the recovery calculation. Several conclusions can be extracted from the obtained results shown in Table 3. First, the recoveries are within the desired range of 90-110%, indicating that the extraction of the analyte in the SPE cartridge did not induce any noticeable isotopic effect. Second, it was not feasible to quantify the target compound in the EWW and IWW by measuring the mass isotopomer distributions of the deprotonated molecular ion due to interferences by co-eluting isobaric compounds. In contrast, the higher selectivity achieved in SRM mode (loss of carbon dioxide group) provides satisfactory recoveries in these complex matrices, demonstrating the need to apply the linear regression procedure to

the fragmented cluster ion. Finally, the acquisition of only 3 transitions was enough to carry out the accurate quantification and confirmation of the compound, even in high matrix load samples such as IWW.

Table 3. Method validation for surface water (SW), effluent waste water (EWW) and influent waste water (IWW). Isotope Pattern Deconvolution (IDMS) recoveries obtained by LC-ESI-MS/MS after SPE preconcentration in pseudo-SRM and SRM mode using different number of transitions. The uncertainty for three independent replicates injected three times corresponds to the combined uncertainty calculated by Kragten approach³⁵. The uncertainty of the average values corresponds to the total combined uncertainty

acquisition mode	number of transitions	recovery (%)		
		surface water	effluent waste water	influent waste water
Pseudo-SRM	10 m/z	97.8 ± 3.3	- ^a	-
	3 m/z	97.3 ± 3.0	-	-
SRM	10 m/z	102.5 ± 3.5	105.3 ± 4.9	109.9 ± 4.2
	3 m/z	102.3 ± 2.1	102.5 ± 4.9	109.6 ± 4.3

^a The preconcentration of the matrix interferences in waste water samples hindered the quantification in the lowest selective mode.

The combined standard uncertainties included in Table 3 were computed for each replicate following the Kragten spreadsheet approach,³⁵ leading to RSD values below 5%. In addition, such method provides the contribution of each parameter to the global combined uncertainty for each analytical result. Full uncertainty budgets were calculated for all individual replicate analysis of all types of water samples using 3 and 10 transitions by applying the multiple linear regression approach. The main sources of uncertainty arose from the experimental measurement of the isotope abundances and the concentration of the isotopically labeled standard, constituting around 99% of the total uncertainty (see Figure S-2, Supporting Information). Minor contributions were also obtained for the sample preparation procedure (weights, dilutions, etc.) and the isotope composition of natural abundance and labeled diclofenac. Therefore, a better certification of the labeled standard concentration as well as a more accurate determination of the isotope composition in the sample could reduce drastically the uncertainty of the analysis.

CONCLUSIONS

Isotope Dilution Mass Spectrometry, based on the deconvolution of isotope patterns by multiple linear regression, has been applied for the first time to tandem MS (QqQ). The need for developing this methodology for tandem MS has been demonstrated in samples of complex matrix (wastewater) where, as expected, there were problems due to coeluting compounds. The developed procedure provides the concentration of the compound in the sample without the need of a calibration graph, so reducing the analysis time. The method has been successfully validated for the determination of the pharmaceutical diclofenac in surface water, effluent wastewater and influent wastewater even for three SRM transitions acquired, making possible the application of this alternative technique in multi-residue analysis. In addition, appropriate confirmation of positive samples was accomplished for transitions of natural diclofenac greatly interfered by the cluster of the labeled analogue. However, contrary to classical calibration strategies an accurate certification of concentration and extent of enrichment of the labeled compound is required, contributing to the total combined uncertainty. Anyway, the main source of uncertainty arose from the experimental measurement of isotope abundances, leading to a RSD around 5%.

Finally, it should be remarked that the use of the proposed approach makes possible the minimal labeling of the analyte, which would minimize the extent of isotopic effects if any and thus would provide more accurate determinations for complex matrix samples.

ACKNOWLEDGEMENT

Fundació Caixa Castelló-Bancaixa is acknowledged for the financial support through the project P1-1B2009-29 and the research contract provided to Angel Castillo. UHPLC-ESI-MS/MS measurements were made at the Servei Central d'Instrumentació Científica (SCIC), Universitat Jaume I. P.R.G and J.I.G.A. acknowledge financial support from the Spanish Ministry of Science and Innovation through project ref. CTQ2009-12814. P.R.-G. acknowledges his research contract to the Spanish Ministry of Science and Innovation through the Ramón y Cajal Program.

REFERENCES

- (1) Richardson, S. D. *Anal. Chem.* 2010, 82, 4742-4774.
- (2) Lambert, J. B.; Shurvell, H. F.; Lightner, D.; Cooks, R. G. *Introduction to Organic Spectroscopy*, Macmillan Publishing Company, New York, 1987, p. 353.
- (3) Meija, J.; Caruso, J. A. J. *Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2004, 15, 654-658.
- (4) Meija, J.; Centineo, G.; García Alonso, J. I.; Sanz-Medel, A.; Caruso, J. A. J. *Mass Spectrom.*, 2005, 40, 807-814.
- (5) Rodríguez-Castrillón, J. A.; Moldovan, M.; Encinar, J. R.; García Alonso, J. I. J. *Anal. At. Spectrom.*, 2008, 23, 318-324.
- (6) Rodríguez-Castrillón, J. A.; Moldovan, M.; García Alonso, J. I. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2009, 394, 351-362.
- (7) Meija, J.; Yang, L.; Caruso, J. A.; Mester, Z. J. *Anal. At. Spectrom.* 2006, 21, 1294-1297.
- (8) Rodríguez-González, P.; Monperrus, M.; García Alonso, J. I.; Amouroux, D.; Donard, O. F. X. J. *Anal. At. Spectrom.* 2007, 22, 1373-1382.
- (9) Meija, J.; Ouerdane, L.; Mester, Z. *Analyst* 2009, 134, 466-471.
- (10) Rodríguez-González, P.; Rodríguez-Cea, A.; García Alonso, J. I.; Sanz-Medel, A. *Anal. Chem.*, 2005, 77, 7724-7734.
- (11) Rodríguez-Castrillón, J. A.; Moldovan, M.; García Alonso, J. I.; Lucena, J. J.; García-Tomé, M. L.; Hernández-Apalaza, L. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2008, 390, 579-590.
- (12) Iglesias, H. G.; Fernández, M. L.; García Alonso, J. I.; Sanz-Medel, A. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2007, 389, 707-713.
- (13) Rojas C. L.; Romera, F. J.; Alcántara, E.; Pérez-Vicente, R.; Sariago, C.; García Alonso, J. I.; Boned, J.; Martí, G. J. *Agric. Food Chem.*, 2008, 56, 10774-10778.
- (14) Rodríguez-Castrillón, J. A.; Hinojosa Reyes, L.; Marchante-Gayón, J. M.; Moldovan, M.; García Alonso, J. I. J. *Anal. At. Spectrom.*, 2008, 23, 579-582.
- (15) Rodríguez-González, P.; García Alonso, J. I. J. *Anal. At. Spectrom.*, 2010, 25, 239-259.
- (16) Castillo, A.; Rodríguez-González, P.; Centineo, G.; Roig-Navarro, A. F.; García Alonso, J. I. *Anal. Chem.*, 2010, 82, 2773-2783.
- (17) González-Gago, A.; Marchante-Gayón, J. M.; Ferrero, M.; García Alonso, J. I. *Anal. Chem.*, 2010, 82, 2879-2887.

- (18) González-Antuña, A.; Rodríguez-González, P.; Centineo, G.; García Alonso, J. I. *Analyst*, 2010, 135, 953-964.
- (19) Gracia-Lor, E.; Sancho, J. V.; Hernández, F. J. *Chromatogr. A*, 2010, 1217, 622-632.
- (20) Kasprzyk-Hordern, B.; Dinsdale, R. M.; Guwy, A. J. *Talanta*, 2008, 74, 1299-1312.
- (21) Batt, A. L.; Kostich, M. S.; Lazorchak, J. M. *Anal. Chem.*, 2008, 80, 5021-5030.
- (22) Marín, J. M.; Gracia-Lor, E.; Sancho, J. V.; López, F. J.; Hernández, F. J. *Chromatogr. A*, 2009, 1216, 1410-1420.
- (23) Bijlsma, L.; Sancho, J. V.; Pitarch, E.; Ibáñez, M.; Hernández, F. J. *Chromatogr. A*, 2009, 1216, 3078-3089.
- (24) García Alonso, J. I. *Anal. Chim. Acta*, 1995, 312, 57-78.
- (25) García Alonso, J. I.; Rodríguez-González, P.; González-Gago, A.; González-Antuña, A. *Anal. Chim. Acta*, 2010, 664, 68-76.
- (26) Stokvis, E.; Rosing, H.; Beijnen, J. H. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2005, 19, 401-407.
- (27) Kato, K.; Jingu, S.; Ogawa, N.; Higuchi, S. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2000, 24, 237-249.
- (28) Wieling, J. *Chromatographia*, 2002, Suppl. 55, S107-S113.
- (29) Valleix, A.; Carrat, S.; Caussignac, C.; Leonce, E.; Tchaplal, A. *J. Chromatogr. A*, 2006, 1116, 109-126.
- (30) Guo, K.; Ji, C.; Li, L. *Anal. Chem.*, 2007, 79, 8631-8638.
- (31) Kim, Y.; Ahn, S.; Chang, T. *Anal. Chem.*, 2010, 82, 1509-1514.
- (32) Itoh, N.; Numata, M.; Aoyagi, Y.; Yaritha, T. *J. Chromatogr. A*, 2007, 1138, 26-31.
- (33) European Union Decision 2002/657/EC, *Off. J. Eur. Commun.*, L221, 2002, pp. 8-36 (12 August 2002).
- (34) European Commission DG-SANCO, Method validation and quality control procedures for pesticide residue analysis in food and feed No. SANCO/2007/3131, 31 October 2007, Brussels (http://ec.europa.eu/food/plant/protection/resources/qualcontrol_en.pdf).
- (35) Kragten, J. *Analyst*, 1994, 119, 2161-2165.

SUPPORTING INFORMATION

Table S-1. MS/MS optimized conditions for determination of diclofenac by UHPLC-ESI-MS/MS in pseudo-SRM and SRM mode

acquisition mode	cone (V)	collision energy (eV)	transitions measured
pseudo-SRM	25	5	294 > 294, 295 > 295, 296 > 296, 297 > 297, 298 > 298, 299 > 299, 300 > 300, 301 > 301, 302 > 302, 303 > 303
SRM	25	10	294 > 250 , 295 > 251, 296 > 252 , 297 > 253, 298 > 254 , 299 > 255, 300 > 356, 301 > 357, 302 > 358, 303 > 359

* In bold transitions selected for the final quantitative determination and confirmation.

Table S-2. Comparison between classical IDMS and Isotope Pattern Deconvolution IDMS recoveries in fortified influent waste water treatment plant without preconcentration for diclofenac. The uncertainty in the values corresponds to 1 s standard deviation of three independent injections

Acquisition mode	Quantification method	Recovery (%)
Pseudo-SRM	IPD, 10 transitions	97.1 ± 2.8
	IPD, 3 transitions	97.2 ± 3.2
	Internal calibration	103.3 ± 2.7
SRM	IPD, 10 transitions	101.2 ± 5.8
	IPD, 3 transitions	98.7 ± 3.1
	Internal calibration	103.3 ± 3.2

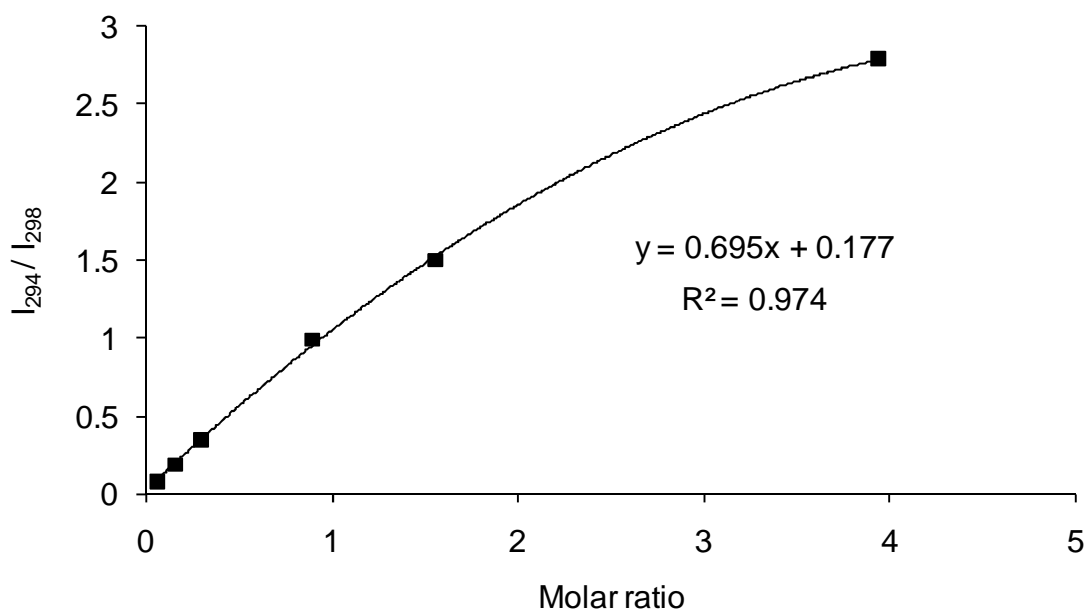


Figure S-1. Calibration graph obtained using UHPLC-ESI-MS/MS corresponding to intensity ratios of the higher abundance ion of natural and labeled diclofenac.

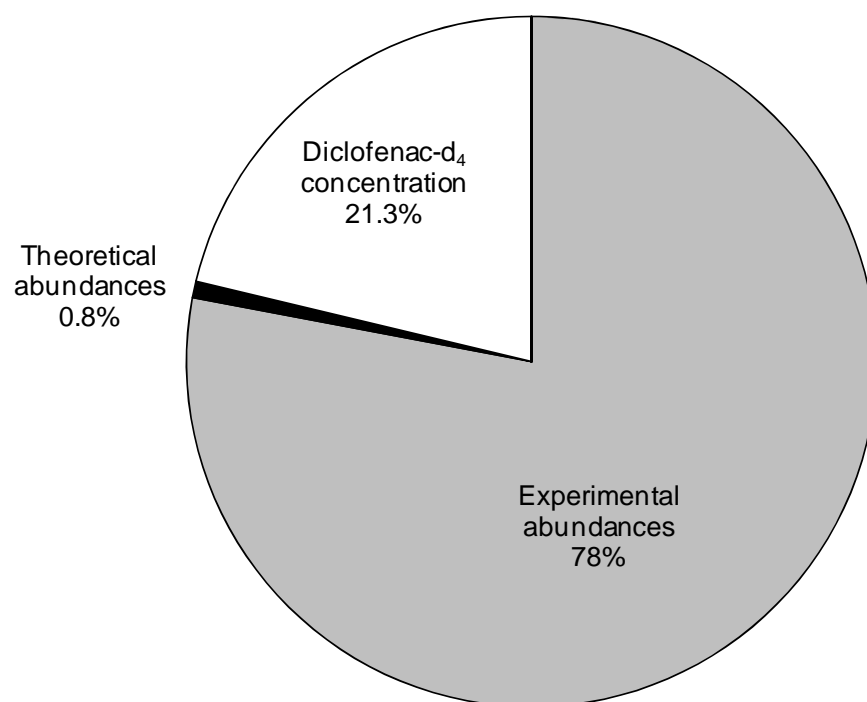


Figure S-2. Full uncertainty budget (in % of total uncertainty) calculated for a fortified influent waste water sample using three SRM transitions.

CAPÍTULO 5

Conclusiones

Son diversas las conclusiones que se pueden extraer del conjunto de investigaciones que conforman la presente tesis doctoral. El uso de microHPLC-ICP-MS ha demostrado ser una interesante alternativa a HPLC-ICP-MS para llevar a cabo la especiación de metales y semi-metales a nivel de trazas y ultratrazas en aguas medioambientales. La reducción del tiempo total de análisis, el menor consumo de fase móvil y muestra así como su mayor tolerancia a la adición de disolventes orgánicos han posibilitado el desarrollo de metodología rápida, sensible y exacta para la determinación de especies de As, Se y Hg. En el caso de muestras biológicas, se ha aplicado la técnica de análisis por dilución isotópica para corregir los problemas asociados a la complejidad de la matriz, proporcionando resultados de alta calidad metrológica. Se ha desarrollado un procedimiento basado en pseudo-dilución isotópica inespecífica para la especiación de As en orina humana sin curva de calibrado e independiente del efecto matriz y la deriva de la señal. Por otro lado, el uso de dilución isotópica específica con trazadores múltiples en GC-EI-MS ha permitido diseñar un método de rutina para la determinación de Hg(II) y MeHg en tejidos de pescado, capaz de corregir las reacciones de interconversión que tienen lugar durante el análisis. Por último, se ha desarrollado una estrategia para realizar la cuantificación y confirmación de compuestos orgánicos sin hacer uso de calibrado metodológico, utilizando los patrones internos marcados isotópicamente como trazadores. El procedimiento ha sido evaluado satisfactoriamente para la determinación del fármaco diclofenaco en aguas residuales por UHPLC-ESI-MS/MS.

Además de estas conclusiones se pueden establecer otras más específicas relacionadas con cada uno de los trabajos realizados:

1. La utilización de fases móviles a pH mayor de 8.5 provoca la hidrólisis de la sílice fundida (PFS) de las conexiones capilares con los que vienen equipados los sistemas microHPLC, dando lugar a la aparición de interacciones adicionales al mecanismo de separación de la columna con los analitos que contienen grupos hidroxilo. Como consecuencia de ello, las especies de As(III), As(V), MMA y Se(IV) eluyen con un ensanchamiento de pico severo, enmascarando incluso la aparición del mismo.
2. A parte de la sustitución de los capilares de PFS por PEEK y la disminución del pH por debajo de 8.5, la adición a la fase móvil basada en NH_4NO_3 de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, que contiene grupos hidroxilo que compiten con los de los analitos, permite eliminar las interacciones adicionales. Esta última estrategia también mejora significativamente la forma de pico de muchos de los analitos estudiados.
3. El uso de columnas microbore, de 0.5-2.1 mm de diámetro interno, permite separar las especies de As y Se estudiadas reduciendo drásticamente el consumo de muestra y fase móvil respecto las convencionales de 4.6 mm. Además, las columnas microbore suelen estar empaquetadas con menores tamaños de partícula, lo que puede aprovecharse para mejorar la resolución o disminuir el tiempo de análisis. Por otro lado, se debe recalcar que la simple reducción del diámetro interno no comporta ninguna mejora en la eficiencia de la separación.
4. Para no comprometer la adecuada resolución de los picos cromatográficos en microHPLC-ICP-MS es indispensable realizar una minimización exhaustiva del volumen extracolumna. En este sentido, el capilar conectado al micronebulizador ha demostrado ser una potencial fuente de ensanchamiento de pico.
5. La capacidad multielemental que ofrece la detección por ICP-MS permite tanto la determinación simultánea de especies de As y Se como la correcta cuantificación de MMA, que en las condiciones de separación utilizadas eluye junto con la interferencia poliatómica $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$, originada por el contenido

salino de la muestra. El uso de una ecuación de corrección basada en la adquisición de $^{40}\text{Ar}^{37}\text{Cl}^+$, que no coeluye con ninguna especie de Se, permite evaluar debidamente la anterior contribución y aplicar el método desarrollado a muestras de agua residual depuradas y no depuradas.

6. La aplicación de microflujos junto con el empleo de micronebulizadores atenúa los efectos adversos derivados de la introducción de disolventes orgánicos en el ICP-MS, ya que proporcionan un incremento en la relación analito/disolvente que se traduce en una mejora de sensibilidad.
7. La separación de compuestos orgánicos e inorgánicos de mercurio por cromatografía líquida ha requerido un gradiente de metanol y la adición del formador de complejos L-cisteína. En estas condiciones, la correcta selección del caudal de gas de nebulización así como la pureza del agente complejante son claves de cara a conseguir una correcta determinación de las especies.
8. El acoplamiento microHPLC-ICP-MS permite llevar a cabo la especiación de Hg en aguas medioambientales mediante inyección directa, minimizando los errores que puede conllevar la manipulación de la muestra y las etapas de derivatización. Sin embargo, para el análisis de aguas con un alto contenido salino es necesario realizar una purificación previa.
9. El estudio de la presencia de especies de As, Se y Hg en el acuífero de la Plana de Castellón no reveló una concentración que pueda considerarse peligrosa para ninguna de ellas. No obstante, se han detectado algunos compuestos organometálicos en diferentes aguas de riego y abastecimiento urbano que sugieren un control periódico de estas muestras en particular.
10. Para llevar a cabo la determinación de As(III) y As(V) por microHPLC-ICP-MS a pH ácido es necesario utilizar una fase móvil basada en fosfato en lugar de nitrato. El método desarrollado se ha aplicado satisfactoriamente al análisis de drenajes ácidos de mina.
11. Se ha comprobado que la técnica de análisis por dilución isotópica inespecífica puede adaptarse a la especiación de As en orina por HPLC-ICP-MS para evitar la curva de calibrado y corregir la inestabilidad instrumental que

provoca la matriz de la muestra. Para ello, es necesario añadir post-columna una disolución de Ge que contenga una cantidad conocida de As, lo que permite utilizar al ^{72}Ge como un pseudo isótopo de As.

12. La determinación de Hg(II) y MeHg en muestras de tejidos de pescado precisa una etapa de extracción que provoca reacciones de interconversión que dependen tanto de las condiciones de extracción como de la matriz. El uso de dilución isotópica con trazadores múltiples garantiza la correcta cuantificación de las especies, pudiéndose aplicar a GC-EI-MS a partir de la distribución de isotopómeros de masa obtenidos, sin necesidad de medir o calcular relaciones isotópicas elementales. Esta estrategia está basada en el procedimiento de deconvolución de perfiles isotópicos y tiene en cuenta la posible presencia de impurezas en las disoluciones de marcado.
13. Se ha comprobado que la deconvolución de perfiles isotópicos permite utilizar los patrones internos de compuestos orgánicos marcados isotópicamente empleados en LC-ESI-MS de manera análoga a las especies de un elemento marcado. Esto hace posible el cálculo de la concentración del analito con la única inyección de la muestra fortificada así como el solapamiento espectral entre el compuesto natural y marcado, lo que abre las puertas al marcaje isotópico mínimo del analito, que minimizaría los efectos isotópicos durante la determinación.
14. El análisis de matrices complejas como agua residual depurada y no depurada provoca la coelución de interferentes isobáricos con el analito, cuyas señales pueden ser discriminadas mediante el uso de espectrometría de masas en tándem (QqQ). Como la distribución de isotopómeros de masa del compuesto se ve modificada durante la fragmentación, se han deducido las ecuaciones necesarias para calcular la contribución del compuesto natural y del marcado a partir del espectro de masas de los iones producto. El procedimiento desarrollado requiere la adquisición de sólo tres transiciones, posibilitando su aplicación a análisis multiresiduales.

15. Estas últimas conclusiones permiten abrir nuevas líneas de investigación. Actualmente, se está llevando a cabo la síntesis y caracterización de diversos disruptores endocrinos marcados con un solo ^{13}C para su determinación simultánea por LC-ESI-MS/MS (QqQ) sin curva de calibrado. El plan de futuro consiste en extender la metodología de cálculo propuesta a diferentes familias de compuestos químicos (plaguicidas, fármacos, tensioactivos,...) para mejorar la exactitud y precisión de los métodos multiresiduales existentes, así como reducir el consumo de reactivos y el tiempo de análisis.

